

**Biotechnische Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glycerin
mit immobilisierten Zellen von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024
und thermophilen Mikroorganismen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Peter Wittlich
aus Koblenz

1. Referent: Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop

2. Referent: PD Dr. Siegmund Lang

eingereicht am 08. Juni 2001

mündliche Prüfung (Disputation) am 23. August 2001

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikationen

WITTLICH P, WILLKE T, VORLOP KD. 1999. Vom nachwachsenden Rohstoff zur Teppichbodenfaser. *ForschungsReport*. **1**:34-37

WITTLICH P, THEMANN A, VORLOP KD. 2001. Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a newly isolated thermophilic strain. *Biotechnology Letters* **23**(6):463-466

JAHNZ U, WITTLICH P, PRÜSSE U, VORLOP KD. 2001. New matrices and bioencapsulation processes. In: Focus on Biotechnology, volume IV "Engineering and manufacturing for biotechnology". HOFMAN M, THONART P, Herausgeber. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht

REIMANN C, WITTLICH P, WILLKE T, JEKEL M, VORLOP KD. 1998. Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit immobilisierten Zellen. 1. Workshop „Biokonversion nachwachsender Rohstoffe“. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe. Landwirtschaftsverlag Münster. **10**:238-245

WITTLICH P, LUTZ J, REIMANN C, WILLKE T, VORLOP KD. 1999. Bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol. 6th Symposium on Renewable Resources, 23.-25.3.1999 Bonn. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe. Landwirtschaftsverlag Münster. **14**:524-532

WITTLICH P, SCHLIEKER M, WILLKE T, VORLOP KD. 1999. Leistungssteigerung biotechnischer Prozesse durch neuartige Immobilisierungsmethoden für Biokatalysatoren am Beispiel der 1,3-Propandiol-Herstellung. 2. Workshop „Biokonversion nachwachsender Rohstoffe“, 14.-15.10.99. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe. Landwirtschaftsverlag Münster. **15**:112-131

WITTLICH P, REIMANN C, LUTZ J, WILLKE T, VORLOP KD. 1999. Immobilisierte Zellen von *Klebsiella pneumoniae* zur Biokonversion von Glycerin in 1,3-Propandiol. 2. Workshop „Biokonversion nachwachsender Rohstoffe“, 14.-15.10.99. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe. Landwirtschaftsverlag Münster. **15**:304-312

Tagungsbeiträge

REIMANN C, WITTLICH P, WILLKE T, VORLOP KD. 1996. Conversion from glycerol into 1,3-propanediol by immobilized cells – Proceedings of the International Workshop on Bioencapsulation V, „From fundamentals to industrial applications“, Potsdam

REIMANN C, WITTLICH P, JEKEL M, WILLKE T, VORLOP KD. 1997. PVAL-immobilized 1,3-propanediol producing bacteria – Proceedings of the International Workshop on Bioencapsulation VI, „From fundamentals to industrial applications“, Barcelona

- REIMANN C, WITTLICH P, WILLKE T, VORLOP KD. 1998. Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit immobilisierten Zellen, 16. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Frankfurt a. M.
- REIMANN C, WELTER K, WITTLICH P, WILLKE T, VORLOP KD. 1998. Bioconversion of renewable resources. In: Proceeding of the international conference „Sustainable agriculture for food, energy and industry: strategies towards achievement“. EL BASSAM N, BEHL RK, PROCHNOW B, Herausgeber. James & James. London
- WITTLICH P, REIMANN C, WILLKE T, VORLOP KD. 1998. Bioconversion of raw-glycerol to 1,3-propanediol by immobilized bacteria, *Biospektrum*, Sonderausgabe zur VAAM Frühjahrstagung 1998, 128.
- WILLKE T, JEKEL M, WITTLICH P, REIMANN C, LUTZ J, VORLOP KD. 1998. Bioconversion of renewable resources to 1,3-propanediol – Proceedings of the International Workshop on Bioencapsulation VII, Easton, Maryland
- JAHNZ U, WITTLICH P, VORLOP KD. 1999. New Apparatus for the Reproducible Production of Small Lens-shaped Hydrogels (LentiKats®) in Lab-Scale, Ninth European Congress on Biotechnology, Brüssel
- DURIEUX A, PEETERS JL, WITTLICH P, VORLOP KD, SIMON JP. 1999. Malolactic fermentation of apple juice by entrapped *Leuconostoc oenos* in LentiKats®, Proceedings of the International Workshop on Bioencapsulation VIII, „Recent Progress in Research and Technology“, Trondheim
- WITTLICH P, SCHLIEKER M, WILLKE T, VORLOP KD. 2000. Bioconversion of raw glycerol to 1,3-propanediol with *Clostridium butyricum* immobilized in LentiKats®. World Congress of Biotechnology 2000, 3.-8.9.2000 Berlin. Book of Abstracts, 4:468
- WITTLICH P, THEMANN A, VORLOP KD. 2000. Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by thermophilic bacteria, World Congress of Biotechnology 2000. 3.-8.9.2000 Berlin. Book of Abstracts, 3:516
- WITTLICH P, THEMANN A, VORLOP KD. 2001. Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by thermophilic bacteria. Tagungsband, 19. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Leipzig 13.03.-15.03.2001
- SCHLIEKER M, BOCK R, KOSCHIK I, WITTLICH P, VORLOP KD. Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit freien und immobilisierten Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024. 7. Symposium „Nachwachsende Rohstoffe für die Chemie“, 20.-22.03.2001. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe. Landwirtschaftsverlag Münster. (im Druck)
- WITTLICH P, REIMANN C, WILLKE T, VORLOP KD. 1998. Bioconversion of raw glycerol to 1,3-propanediol by immobilized bacteria. DGF 52nd International Congress, Magdeburg
- WITTLICH P, VORLOP KD. 1998. New processing methods for bioconversions: Immobilized biocatalysts. Vortrag CTVO-NET Workshop „New applications for vegetable oils“, Kopenhagen 08.-09.12.1998. URL: <http://www.dainet.de/fnr/ctvo/newuse/vorlop.doc>
- VORLOP KD, WITTLICH P. 1999. Microbial conversion of glycerol towards 1,3-propanediol. Vortrag CTVO-NET Workshop „Co-Products: Glycerine“, Paris 21.01.1999 URL: <http://www.dainet.de/fnr/ctvo/byproducts/vorlop.ppt>

- WITTLICH P, SCHLIEKER M, JAHNZ U, WILLKE T, VORLOP KD. 1999. Bioconversion of Raw Glycerol to 1,3-Propandiol by Immobilized Bacteria, Ninth European Congress on Biotechnology, 11.-15.07.1999 Brüssel, CE01, ECB9/2762, abstract book/CD
- WITTLICH P, SCHLIEKER M, WILLKE T, VORLOP KD. 1999. Bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol by *C. butyricum* immobilized in LentiKats[®] bacteria, Proceedings of the International Workshop on Bioencapsulation VIII, „Recent Progress in Research and Technology“, Trondheim 13.09.-15.09.1999, O-9
- WITTLICH P, SCHLIEKER M, WILLKE T, VORLOP KD. 1999. Leistungssteigerung biotechnischer Prozesse durch neuartige Immobilisierungsmethoden für Biokatalysatoren am Beispiel der 1,3-Propandiol-Herstellung. 2. Workshop „Biokonversion nachwachsender Rohstoffe, Braunschweig, 14.-15.10.1999
- WITTLICH P, JAHNZ U, VORLOP KD. 2001. LentiKats[®] - neue Chancen für biotechnische Prozesse durch Immobilisierung von Biokatalysatoren in Hydrogelpartikel. Tagungsband, 19. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Leipzig 13.03.-15.03.2001

Symbole und Abkürzungen

Symbole

~	etwa, circa
Ø	Durchmesser
μ	spezifische Wachstumsrate
<i>J</i>	Temperatur nach Celsius

Abkürzungen

3-HPA	3-Hydroxipropionaldehyd
A	spezifische Aktivität
AB	Anaerobierbank
ADP	Adenosin-di-phosphat
AME	Altfettmethylester
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BAB	Biomasseanfangsbeladung
BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
<i>c</i>	Konzentration
CSTR	continuously stirred tank reactor, kontinuierlicher Rührkessel
Cys	Cystein
<i>D</i>	<i>dilution rate</i> , Verdünnungsrate
D	Diffusionskoeffizient
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
<i>g</i>	einfache Erdbeschleunigung, $9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$
GC	Gaschromatographie
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
<i>h</i>	Höhe
jato	Jahrestonnen, Tonnen je Jahr
HE	Hefeextrakt
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
IB	Immobilisierter Biokatalysator
k.A.	keine Angabe(n)
k.W.	kein Wachstum
k_s	Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit
<i>m</i>	Masse
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MinS	Mineralsalzmedium
MO	Mikroorganismus, Mikroorganismen
M_w	Molekulargewicht
n.a.	nicht auswertbar
n.n.	nicht nachweisbar

NADH ₂	Nicotinamid-Dinukleotid
NP	Nebenprodukt(e)
NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory</i>
NS	Nährsalz(e)
OD	Optische Dichte, Extinktion
P	volumetrische Produktivität
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , gepufferte physiologische Salzlösung
PD	1,3-Propandiol
PG	Pharmaglycerin, Reinglycerin 99,5 %
ppm	<i>parts per million</i> , mg je kg
PTT	Polytrimethylenterephthalsäure
PVA	Polyvinylalkohol
RCM	<i>reinforced clostridia medium</i>
RCMPG	RCM mit Reinglycerin
RG	Rohglycerin
RI	<i>refraction index</i> , Brechungsindex
RT	Raumtemperatur
SL	Spurenelementelösung
<i>t</i>	Zeit
<i>T</i>	Transmission
<i>t_d</i>	Verdopplungszeit
TM	Thermophilen-Medium
TU	Technische Universität
ÜR	Überlebensrate
ÜS	Überstand
<i>v</i>	Reaktionsgeschwindigkeit
VL	Vitaminlösung
V	Volumen
vvm	Volumen Gas je Volumen Flüssigkeit und Minute
Y	<i>yield</i> , molare Ausbeute (mol Produkt je mol Substrat)
Y'	<i>yield</i> , Ausbeute berechnet nach Massen (kg Produkt je kg Substrat)
Z	Zelldichte, Zellen je mL

Indizes

605 nm	Optische Messung bei einer Wellenlänge von 605 nm
a	Außen
Ac, HAc	Acetat, Essigsäure
aq.	in wässriger Lösung
B	Biomasse
Bu, HBu	n-Butyrat, n-Buttersäure
EtOH	Ethanol
Glyc	Glycerin
i	innen
IB	immobilisierter Biokatalysator

Lac, HLac	Lactat, Milchsäure
Lenti	LentiKat [®]
max	maximal, Maximalwert
PD	Propandiol
R	Reaktionsmischung
RME	Rapsölmethylether, Biodiesel
Sacch	Saccharose
Suc, H ₂ Suc	Succinat, Bernsteinsäure

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung der Arbeit	3
3	Stand der Technik – Theoretische Grundlagen	4
3.1	Zur Bedeutung und Herstellung von 1,3-Propandiol	4
3.1.1	Chemisch-synthetische Herstellung von 1,3-Propandiol	6
3.1.2	Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol	6
3.1.3	<i>Clostridium butyricum</i>	11
3.1.4	Thermophile Mikroorganismen	14
3.1.5	Aufarbeitung und Gewinnung des 1,3-Propandiols	17
3.2	Immobilisierte Biokatalysatoren	17
3.2.1	Definition	17
3.2.2	Einschlussverfahren	19
3.2.3	Immobilisierung in Poyvinylalkohol-Hydrogele	20
3.2.4	Linsenförmige PVA Hydrogelpartikel - LentiKats®	20
3.2.5	Überlegungen zur Biomasseverteilung im Immobilisat und Begriffsklärung	21
4	Material und Methoden	24
4.1	Verwendete Bakterienstämme und Kulturen	24
4.1.1	Beschaffung des Probenmaterials für Screeningversuche mit thermophilen Mikroorganismen	24
4.1.2	Anreicherung, Screening und Isolierung von thermophilen PD Bildnern	26
4.2	Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Spezialchemikalien	27
4.2.1	Mineralsalzmedium zur Kultivierung von <i>C. butyricum</i> NRRL B-1024	27
4.2.2	Medien zur Untersuchung der Sporenbildung bei <i>C. butyricum</i> NRRL B-1024	28
4.2.3	Medien zur Anreicherung und Untersuchung thermophiler Mikroorganismen	28
4.2.4	Verwendete Spurenelemente- und Vitaminlösungen	30
4.2.5	Verwendete Glycerinsorten	30
4.2.6	Sonstige Lösungen	32
4.2.7	Verwendete Spezialchemikalien	32
4.3	Bereitung der anaeroben Medien	32
4.4	Stammhaltung	33
4.5	Anzucht von <i>C. butyricum</i> für die Immobilisierung	33
4.6	Immobilisierung von <i>C. butyricum</i> in linsenförmige Gele auf Basis von PVA – LentiKats®	33
4.6.1	Vorbereitung der Polymerlösung	33
4.6.2	Herstellung von LentiKats®	34
4.6.3	Nachbereitung der LentiKats®	35
4.7	Immobilisierung des thermophilen Stammes AT1 in Alginatperlen	35
4.8	Versuche im Kulturkolben oder Injektionsvials – Aktivitätstests	36

4.8.1	Thermophile Mikroorganismen	36
4.8.2	<i>Clostridium butyricum</i> NRRL B-1024	36
4.9	Versuche im Fermenter	36
4.9.1	Batch-Fermentation des thermophilen Stammes AT1	37
4.9.2	Batch- und fed-batch-Fermentationen von <i>C. butyricum</i> NRRL B-1024	37
4.9.3	Kontinuierliche Fermentation von <i>C. butyricum</i> NRRL B-1024	37
4.10	Entnahme von Proben und Probenaufbereitung	39
4.11	Analytik	39
4.11.1	Bestimmung von Metaboliten mit Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	39
4.11.2	Bestimmung von Metaboliten mit Gaschromatographie (GC)	40
4.11.3	Bestimmung von H ₂ und CO ₂ in Abluftproben mit Gaschromatographie (GC)	40
4.11.4	Biomassebestimmung	40
4.11.5	Mikroskopische Untersuchungen	42
5	Ergebnisse und Diskussion – Immobilisierung in LentiKats®	44
5.1	Herstellung	44
5.1.1	Herstellung mit Spritze und Kanüle	44
5.1.2	Herstellung mit dem LentiKat®Printer	44
5.2	Dünnschnitte von zellbeladenen LentiKats®	45
5.3	Einfache Untersuchungen zur Stoffdiffusion	46
5.4	Entsorgen von LentiKats®	47
6	Ergebnisse und Diskussion – Thermophile PD-Bildung	48
6.1	Anreicherung und Screening	48
6.2	Untersuchungen mit der thermophilen Kultur PW2	50
6.3	Kultivierung des thermophilen Stammes AT1	54
6.3.1	Untersuchungen freier Zellen von AT1 im Injektionsvial	54
6.3.2	Fermentation freier Zellen von AT1	59
6.3.3	Untersuchungen mit immobilisierten Zellen von AT1	63
7	Ergebnisse und Diskussion – PD-Bildung mit <i>Clostridium butyricum</i>	69
7.1	Charakterisierung suspendierter Zellen	69
7.1.1	Einfluss der Substratkonzentration	69
7.1.2	Nutzung von Rohglycerin	71
7.1.3	Inhibierung durch Hemmstoffe aus Rohglycerin	72
7.1.4	Produktinhibierung	73
7.1.5	Leistungsfähigkeit von <i>C. butyricum</i> NRRL B-1024	73
7.1.6	Wachstum auf Kohlenhydraten als zusätzlicher C-Quelle	75
7.2	Immobilisierung der Sporen von <i>C. butyricum</i> NRRL B-1024	77
7.2.1	Steigerung der Sporenmenge	78
7.2.2	Überprüfung der Eignung von erzeugten Clostridiensporen	79

7.3	Immobilisierung in LentiKats®	80
7.4	Anzucht der Biomasse	81
7.5	Einfluss der Biomasseanfangsbeladung	81
7.6	Herstellung von LentiKats®	83
7.6.1	Trocknungszeit	83
7.6.2	Unterschiedliche Rückquellmedien	85
7.7	Untersuchungen im Schüttelkolben	86
7.7.1	Beeinträchtigung der Koloniebildung durch Verunreinigungen im Rohglycerin	86
7.7.2	Substratlimitierung immobilisierter Clostridien	87
7.8	Laugezugabe als Maß für die PD-Bildung	88
7.9	Untersuchung von LentiKats® in batch- und fed-batch-Fermentationen	89
7.9.1	Anzucht der Biomasse	89
7.9.2	Temperatursenkung zur Lagerung der LentiKats®	90
7.9.3	Verwertung verschiedener Rohglycerine	91
7.9.4	Glycerininibierung- und -limitierung	91
7.9.5	Limitierung durch Nährstoffe	92
7.9.6	Produktinibierung	93
7.9.7	Vergleich immobilisierter und freier Zellen von <i>C. butyricum</i> NRRL B-1024	95
7.9.8	Kontaminationsgefahr bei batch-Fermentationen	95
7.10	Untersuchungen von LentiKats® in kontinuierlicher Fermentation	97
7.10.1	Sauerstofffreies Medium, online Medienbereitstellung, Sterilität	98
7.10.2	Einfluss der Temperatur auf <i>C. butyricum</i> NRRL B-1024 in LentiKats®	99
7.10.3	Einfluss des pH-Wertes auf <i>C. butyricum</i> NRRL B-1024 in LentiKats®	100
7.10.4	Glycerinlimitierung und -inibierung	102
7.10.5	Einfluss der Verdünnungsrate	104
7.10.6	Limitierung durch Nährstoffe – Einfluss von Hefeextrakt	106
7.10.7	Einsatz von Rohglycerinwasser	109
7.10.8	Langzeitstabilität und -aktivität	109
8	Zusammenfassung und Ausblick	111
8.1	PD-Bildung mit thermophilen Mikroorganismen	111
8.2	Reproduzierbare Immobilisierung in LentiKats®	111
8.3	PD-Bildung mit <i>C. butyricum</i> NRRL B-1024 – Immobilisierung in LentiKats®	112
9	Literatur	119
10	Liste der Veröffentlichungen	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

Seit einiger Zeit ist ein wachsendes Interesse an 1,3-Propandiol (PD) zu beobachten. PD hat das Potenzial, eine neue *commodity* Chemikalie zu werden, die insbesondere für die Herstellung von neuartigen Kunststoffen Verwendung findet. In den USA sind vom Shell-Konzern bereits Anlagen zur synthetischen Herstellung von PD und darauf basierender Kunststoffe für Textilien und vor allem für Teppichfasern (CHUAH 1995) errichtet worden. Daneben existieren eine Reihe verschiedener Strategien zur Entwicklung eines biotechnischen Prozesses auf Basis nachwachsender Rohstoffe, die mit der chemisch-synthetischen Produktion von PD konkurrieren.

Die mikrobielle Umwandlung von Glycerin zu 1,3-Propandiol wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Dabei wurden gute Kenntnisse zum anaeroben Glycerinstoffwechsel und zu kinetischen Daten erarbeitet (BIEBL 1991, BIEBL *et al.* 1999, DECKWER 1995, MENZEL *et al.* 1997, REIMANN A *et al.* 1998a, SAINT-AMANS *et al.* 1994, TAG 1990, ZENG *et al.* 1994). Es wurden verschiedene Ansätze verfolgt, die Wirtschaftlichkeit der mikrobiellen Herstellung von PD zu steigern. Eine Erhöhung der PD-Ausbeute (BIEBL und MARTEN 1995, REIMANN A *et al.* 1996) und der Produkttoleranz (ABBAD-ANDALOUSSI *et al.*, 1995, REIMANN A *et al.* 1998a) wurde durch Limitierung und Mutationsexperimente sowie durch Einsatz gentechnischer Methoden angestrebt (CAMERON *et al.* 1998, SKRALY 1997). Die Produktivität konnte vor allem durch geeignete Fermentationsführung wie etwa Hochzelldichtefermentation bis auf eine PD-Produktivität von etwa $21 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ gesteigert werden (REIMANN A *et al.* 1998). Die Verwertung von Rohglycerinen zur Kostenreduktion wurde hingegen nur selten untersucht (GÜNZEL 1991, PAPANIKOLAOU *et al.* 2000, PETITDEMANGE *et al.* 1995).

Aufgrund des wachsenden Marktes und des gestiegenen Interesses an PD versucht der US-amerikanische Kunstfaserhersteller Dupont in Kooperation mit Genencor eine Produktion des Diols auf Basis von Glucose durch Einsatz gentechnisch veränderter Mikroorganismen. Durch Gentransfer von einem natürlichen PD-Produzenten, z.B. *K. pneumoniae*, auf eine Glycerin produzierende Hefe oder durch Klonierung aller erforderlichen Gene in *E. coli* soll an Stelle von Glycerin *direkt* Glucose als kostengünstigerer Rohstoff für die PD Herstellung genutzt werden (BIEBL *et al.* 1999, CAMERON *et al.*, 1998, POTERA, 1997).

Fast alle der erwähnten Fermentationsprozesse sind mehr oder weniger anfällig für Kontaminationen und müssen demzufolge steril durchgeführt werden. Daneben sind die Produktivitäten mit 5 bis $10 \text{ g}_{\text{PD}} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ gering. Die produktive Hochzelldichtefermentation leidet unter dem Problem des Verstopfens der Filtermembranen, die zur Zellrückhaltung und damit Aufkonzentrierung benutzt werden (REIMANN A *et al.* 1998b). Informationen zum Fortschritt bei der Herstellung von PD aus Glucose sind kaum verfügbar. Während CAMERON *et al.* 1998 noch sehr geringe Produktivitäten und Produktkonzentrationen erreichten, meldete Dupont in 2000 den unmittelbar bevorstehenden Durchbruch bei der Nutzung der GVO. Ein gemeinsames Patent von Dupont und Genencor, das 2001 veröffentlicht wurde, gibt im Beispielteil Daten zu einer Fermentation mit einem gentechnisch veränderten *E. coli*. Dieser bildet *aerob* auf Glucose bis zu $129 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PD mit einer Produktivität von etwa $1,7 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$. Dem Kultivierungsmedium werden hierbei Vitamine und Antibiotika zugesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein alternativer Weg beschritten, die beschriebenen Probleme von hohen Rohstoffkosten, Kontaminationen, geringer Produktivität und aufwändiger Prozessführung zu überwinden: die Nutzung einschlussimmobilisierter Bakterienzellen. Zwar ist der Nutzen einer Immobilisierung für verschiedene biotechnische Verfahren unbestritten, jedoch

sind nur verhältnismäßig wenige Prozesse mit einschlussimmobilisierten Biokatalysatoren etabliert. Die weit verbreiteten Techniken des Einschlusses in Gele aus *natürlichen* Polymeren wie etwa Alginat, κ -Carrageenan, Chitosan oder Pektin zeigen erhebliche Nachteile, die eine industrielle Nutzung meist verhindern: eine unzureichende mechanische Stabilität und die Gefahr unerwünschter Bioabbaubarkeit. Bei Nutzung von Hydrogelen aus *synthetischen* Polymeren, wie beispielweise dem kostengünstigen Polyvinylalkohol (PVA), sind die genannten Probleme vernachlässigbar.

Bei Verwendung der richtigen Technik ist der Einschluss in PVA-Hydrogele zudem ähnlich schonend wie bei Nutzung natürlicher Polymere. Ein Einschluss von *Clostridium butyricum* in PVA-Perlen nach der sogenannten *freezing-thawing*-Methode (LOZINSKY *et al.* 1986, VORLOP und REMMERS 1990) erwies sich für *Clostridium butyricum* als wenig geeignet. Aufgrund des niedrigen mikrobiologischen Risikos und der erreichbaren hohen PD-Ausbeute ist der Einsatz von Clostridien jedoch wünschenswert. Daher wurde für die Immobilisierung die schonendere Methode des Einschlusses in PVA-Hydrogele bei Raumtemperatur eingesetzt, die zu linsenförmigen Gel-Partikeln, sogenannten LentiKats[®], führt. Deren großes Potenzial für den Einschluss eines PD produzierenden Stammes von *K. pneumoniae* ist bereits von LUTZ 1999 beschrieben worden.

Neben der Einschlussimmobilisierung von *C. butyricum* wurde auch die Nutzung thermophiler MO für die Produktion von PD untersucht. Durch Einsatz von Thermophilen sollten – ausreichende Leistungsfähigkeit der Bakterien vorausgesetzt - die Herstellungskosten für PD nochmals zu senken sein und damit die Konkurrenzfähigkeit eines biotechnischen Verfahrens wachsen. Die Fähigkeit zur Bildung von PD ist bislang für thermophile MO nicht untersucht worden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol (PD) auf Basis nachwachsender Rohstoffe bietet eine mögliche Alternative zur chemischen Synthese dieses Diols. Voraussetzung für die technische Realisierung eines biotechnischen Prozesses ist jedoch die Wettbewerbsfähigkeit. Folgende Aspekte sind direkte oder indirekte Grundlagen für ein solches konkurrenzfähiges Verfahren:

- Möglichkeit zur Nutzung kostengünstiger Roh- und Hilfsstoffe
- Nutzung eines ungefährlichen Produktionsstammes
- hohe Produktivität, Produktausbeute und –konzentration
- hohe Prozessstabilität bei geringem Aufwand
- kostengünstige Aufreinigung des Produktes

Mit Blick auf die gestellten Herausforderungen sollen mit dieser Arbeit Fortschritte in Richtung einer guten Wirtschaftlichkeit und einer möglichen technischen Realisierung der biotechnischen PD-Herstellung erzielt werden.

Die Nutzung thermophiler Mikroorganismen kann in verschiedener Hinsicht biotechnische Prozesse effizienter machen, insbesondere unter dem Aspekt einer einfacheren Prozessführung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in einem breit angelegten Screening thermophile, PD bildende Bakterienstämme gefunden, angereichert und isoliert. Leistungsfähige Vertreter wurden bezüglich ihrer Anforderungen bei der PD-Bildung charakterisiert und fermentiert, um so das Potenzial thermophiler Mikroorganismen für die PD-Herstellung abzuschätzen.

Im Bereich der Nutzung mesophiler PD bildender Bakterienstämme wurde die Einschlussimmobilisierung von *C. butyricum* NRRL B-1024 untersucht und optimiert, um so insbesondere die Produktivität aber auch die Prozessstabilität zu steigern und die Prozessführung zu vereinfachen. Zentraler Bestandteil war dabei die Entwicklung einer reproduzierbaren Immobilisierungsmethode, die auch den Einschluss der O₂-sensitiven Clostridien bei ausreichender Überlebensrate erlaubt. Dies umfasst sowohl die Vorkultivierung der Zellen als auch die Herstellung und Handhabung der Immobilisate bis zur Kultivierung.

Entsprechende Immobilisate wurden in Schüttelkolben- und Fermentationsexperimenten kultiviert und charakterisiert. Neben der Optimierung zentraler Einflussgrößen wie der Substrat- und Nährstoffversorgung, des pH-Wertes und der Temperatur, wurden insbesondere bei den Fermentationsexperimenten Möglichkeiten zu einer Vereinfachung der Prozessführung z.B. in Bezug auf Medienbereitung, Sauerstoffentfernung und Anforderungen an die Sterilität erforscht. Grundlage der Experimente war die Nutzung verschiedener kostengünstiger Rohglycerine für die Umsetzung zu PD.

3 Stand der Technik – Theoretische Grundlagen

3.1 Zur Bedeutung und Herstellung von 1,3-Propandiol

4

1,3-Propandiol, auch unter den Bezeichnungen Trimethylenglykol (TMG), 3G oder PDO bekannt, hat in den letzten Jahren erheblich an Interesse und Bedeutung gewonnen. Zwar wurde schon lange vermutet und auch bestätigt, dass PD positive Eigenschaften und eine sehr gute Eignung für die Herstellung neuartiger Kunststoffe hat (WITT *et al.* 1994) doch stand dem großtechnischen Einsatz von PD die sehr teure chemische Herstellung nach dem Acrolein-Verfahren entgegen (vgl. 3.1.1). 1,3-Propandiol wurde daher vorwiegend als Basis für Schmierstoffadditive und in der Lackindustrie eingesetzt. Durch ein neues chemisch-synthetisches Verfahren auf Basis von Ethylenoxid (vgl. 3.1.1) ist eine rentable PD-Produktion möglich und es entsteht ein Markt für das Diol mit einer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten, vor allem durch den Einsatz als Diol-Komponente bei der Herstellung von Polyestern, z.B. Polytrimethylenterephthalat (PTT) für Teppichbodenfasern (CHUAH 1996).

Parallel zum Interesse an PD stieg in den letzten Jahren auch das Interesse an der seit langer Zeit bekannten *mikrobiologischen Produktion* von PD (BIEBL *et al.* 1999, DECKWER 1995, HUMPHREYS 1924, MICKELSON und WERKMAN 1940). Eine Umsetzung von Glycerin zu 1,3-Propandiol unter Sauerstoffausschluss ist für verschiedene Bakterienstämme beschrieben. Prinzipiell geeignet sind jedoch nur wenige Stämme, neben *Citrobacter freundii* vor allem *Clostridium butyricum* und *Klebsiella pneumoniae* (vgl. 3.1.2).

Eine Vielzahl von Arbeiten beschäftigt sich mit Möglichkeiten der Rentabilitätssteigerung eines biotechnischen Verfahrens auf Basis nachwachsender Rohstoffe. Nur wenige Untersuchungen zur Nutzung kostengünstiger Rohglycerine für die Umsetzung wurden durchgeführt (GÜNZEL 1991, PETITDEMANGE *et al.* 1995). Viele Arbeiten beschäftigen sich mit Versuchen, die Ausbeute an PD (BIEBL und MARTEN 1995, REIMANN A *et al.* 1996) oder die Produkttoleranz der Bakterien (ABBAD-ANDALOUSSI *et al.* 1995, REIMANN A *et al.* 1998a) zu erhöhen. Daneben wurden Versuche unternommen, die Produktivität der PD Herstellung zu steigern, beispielsweise durch Zellrückhaltung (REIMANN A *et al.* 1998b). Ein von diesen Arbeiten grundlegend verschiedener Weg ist die mikrobielle Herstellung von PD auf Basis von Kohlenhydraten durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen (vgl. 3.1.2, BIEBL *et al.* 1999, CAMERON *et al.* 1998, SKRALY 1997).

Bei der Herstellung von 1,3-Propandiol konkurrieren also chemisch-synthetische und biotechnische Verfahren miteinander. Von entscheidender Bedeutung sind die Herstellungskosten. Einen Vergleich gibt Abbildung 3-1. Die Abbildung verdeutlicht, dass insbesondere die *Rohstoffkosten* die Gesamtkosten stark beeinflussen. Diese Kosten sind erfahrungsgemäß erheblichen Schwankungen unterworfen. Bei den chemischen Verfahren ist es der Rohölpreis, bei den biotechnischen Verfahren der Preis für Glucose oder Glycerin. Dem Vergleich in Abbildung 3-1 liegt ein mittlerer Rohölpreis für das Jahr 1997 zugrunde. Dieser lag nach eigenen Recherchen bei etwa 18 bis 19 US\$ je Barrel (Tecson 1999). Bis zum Herbst 2000 ist der Preis mit etwa 35 US\$ auf fast das doppelte angestiegen (Tecson 2000). Dies lässt den Vergleich der chemischen und biologischen Verfahren in anderem Licht erscheinen, da sich der höhere Rohölpreis mit etwa 500 US\$ je t im Produktpreis niederschlägt.

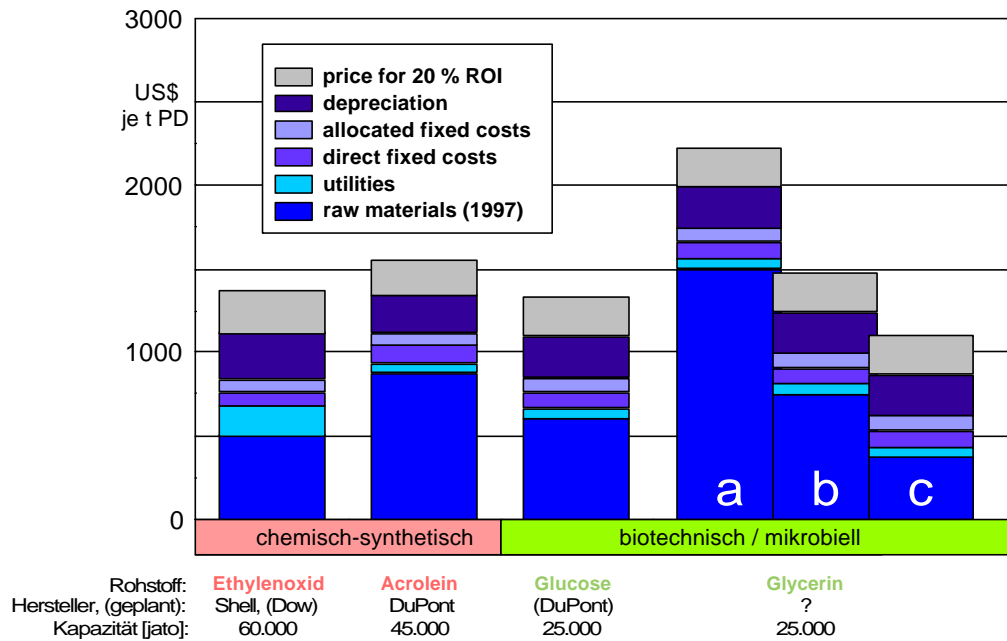


Abbildung 3-1: Vergleich der Kosten chemisch-synthetischer und biotechnischer Verfahren zur Herstellung von 1,3-Propandiol auf Basis einer BIOTICA-Marktstudie von 1999, die durch eigene Berechnungen ergänzt wurde (BIOTICA 1999). Die ersten drei Säulen sowie die erste Säule (a) der Dreiergruppe stammen direkt aus der Marktstudie. Die beiden Säulen b und c sind unter Annahme eines geringeren Rohstoffpreises aus Säule a entstanden. Den Säulen für eine Biokonversion von Glycerin liegen Rohstoffkosten von a 1000 DM, b 500 DM bzw. c 250 DM je t Glycerin zugrunde. Der Rohzuckerpreis lag 1997 bei durchschnittlich etwa 420 DM je t (Wirtschaftliche Vereinigung Zucker 2001). Die angegebenen Kapazitäten benennen nicht die aktuelle Produktion sondern die Produktionsmenge, auf der die Studie basiert.

Die günstigste chemisch-synthetische Variante ist auf Basis der Preise 1997 das Ethylenoxid-Verfahren. Bei den biotechnischen Verfahren erscheint die Nutzung von Glucose erheblich günstiger als die von Glycerin. Die der Abbildung zugrunde liegende Studie geht dabei jedoch von einem Preis von etwa 1000 DM je t Glycerin aus (a). Der Preis kann jedoch bei Verwendung sehr günstiger Rohglycerinchargen erheblich darunter liegen. Bei Annahme eines Glycerinpreises von 500 DM je t ergibt sich das in der Abbildung in der mittleren Säule gezeigte Bild (b). Noch niedrigere Preise lassen sich kaum durch offizielle Marktdaten belegen, da solche Chargen, z.B. verdünnte Rohglycerinwässer, praktisch nicht gehandelt werden. Nach Gesprächen mit Vertretern verschiedener Betriebe, in denen Glycerine als Nebenprodukt anfallen, erscheint ein Preis von 250 DM je t Glycerin denkbar (c).

Neben den geringeren Rohstoffkosten ist hier auch die angestrebte *Verfahrensvereinfachung* und eine Nutzung bestehender Anlagen berücksichtigt. Bei unsterilem Betrieb sollten sich die Kosten für die Anlage, für Energie und Personal verringern. Für eine gegebene Menge an zu produzierendem PD verkleinert sich durch eine *hohe Produktivität* die notwendige Anlage insgesamt. Für die Aufarbeitung sollten *bestehende Anlagen* genutzt werden können, da niedrig konzentrierte Rohglycerinwässer ohnehin direkt bei den oleochemischen Anlagen destillativ aufkonzentriert werden. Die PD Herstellung ist also insbesondere für Betreiber von Fettspaltsanlagen interessant.

Nach der in Abbildung 3-1 gezeigten Studie liegt der Preis, zu dem PD biotechnisch produziert werden muss, um konkurrenzfähig zu sein, also im Bereich von 2,50 bis 3,- DM je Kilogramm. Bei hohem Rohölpreis können es auch 3,50 bis 4,- DM sein.

3.1.1 Chemisch-synthetische Herstellung von 1,3-Propandiol

Wie bereits erwähnt gibt es zwei verschiedene Wege zur chemisch-synthetischen Herstellung von 1,3-Propandiol. Die Schritte der auf Acrolein oder Ethylenoxid basierenden Verfahren sind in Abbildung 3-2 dargestellt.

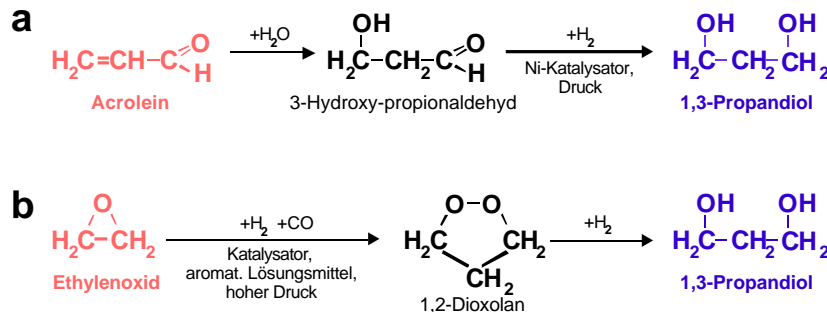


Abbildung 3-2: Wege zur chemisch-synthetischen Herstellung von 1,3-Propandiol: **a** Acrolein-Verfahren (Degussa/Dupont), **b** Ethylenoxid-Verfahren (Shell, Dow Chemical/Union Carbide).

Das Acrolein-Verfahren ist durch eine notwendige Zwischenextraktion und die destillative Aufreinigung aufwändig. Zusätzlich sind die Verluste am sehr giftigen Acrolein hoch – die Ausbeute beträgt etwa 0,59 kg PD je kg Acrolein (ELM 1996) und liegt damit in Bereichen, die auch mit Mikroorganismen auf Basis von Glycerin erreicht werden. Eine Anlage für die Herstellung von 1,3-Propandiol aus Acrolein in Wesseling bei Köln mit einer Kapazität von etwa 10.000 t/a wurde 1997 von Degussa an Dupont verkauft. Dupont wird mit dieser Anlage sowie einer neuen Anlage nach gleichem Verfahren und einer Kapazität von 50.000 t/a seinen Bedarf an PD decken, bis der in Zusammenarbeit mit Genencor entwickelte biotechnische PD Prozess konkurrenzfähig und aufgebaut ist. Parallel zur PD Herstellung hat Dupont seine Kontakte zur mexikanischen Firma Alpek, einem Produzenten von Terephthalsäure, verstärkt. Dupont ist demnach wie Shell Chemicals an einer Produktion von PTT interessiert (ConduxConsulting 2000a), welches unter dem Markennamen Sorona™ vermarktet werden soll (Dupont 2000). Zudem verstärkt Dupont durch eine Zusammenarbeit mit dem englischen Tate&Lyle Konzern seine Position auf dem Gebiet der biotechnischen Herstellung von Chemiegrundstoffen aus nachwachsenden Rohstoffen (Tate&Lyle 2000).

Das Ethylenoxid-Verfahren wird von Shell Chemicals in einer Anlage in Geismar zur Produktion von etwa 80.000 t/a PD eingesetzt, das in eigenen Anlagen z.B. in Altamira, Mexiko zur Herstellung von PTT Pellets sowie in einer spanischen Anlage von Catalana de Polimers zur Herstellung von PTT Fasern verwendet werden soll. Shell vermarktet PTT unter dem Markennamen Corterra® (Shell 2000). Shell Chemical beabsichtigt nicht, PD an konkurrierende PTT Hersteller zu verkaufen (ConduxConsulting 2000b). Neben Shell plant auch DowChemical zusammen mit Union Carbide, einem weltweit führenden Hersteller von Ethylenoxid, 1,3-Propandiol nach dem Ethylenoxid-Verfahren herzustellen (ConduxConsulting 2000c).

3.1.2 Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol

Biotechnische, mikrobielle Verfahren zeichnen sich gegenüber chemisch-synthetischen Verfahren durch eine bessere Umweltverträglichkeit aus. Die Reaktionen laufen meist in wässrigem Millieu, ohne Zusatz von Lösungsmitteln und Metallkatalysatoren, bei moderaten Temperaturen und Drücken ab.

Biotechnische Verfahren nutzen fast immer nachwachsende Rohstoffe, d.h. die hergestellten Produkte sind im Gegensatz zur Nutzung fossiler Rohstoffe CO₂ neutral. Diese Umweltfreundlichkeit lässt sich natürlich auch für Werbezwecke nutzen. So werben beispielsweise Dupont und Genencor mit der Produktion von „Grünen Polyestern“ (POTERA 1997).

Den genannten Vorteilen stehen verschiedene mögliche Nachteile der biotechnischen Verfahren gegenüber: niedrige Produktkonzentration in wässrigem Medium, niedrige Produktivität, hoher apparativer Aufwand, geringe Prozessstabilität.

Diese Nachteile müssen bei der Entwicklung biotechnischer Prozesse stets berücksichtigt und nach Möglichkeit minimiert werden.

Es sind zwei grundlegende Vorgehensweisen zur mikrobiellen Herstellung in der Diskussion: die eine verfolgt die Umsetzung von Glycerin durch natürliche Mikroorganismen, die andere die Nutzung von Kohlenhydraten durch gentechnisch veränderte Organismen.

Nutzung von Glycerin

Marktvolumen und -situation

Glycerin ist ein bedeutender Grundstoff mit einem großen Marktvolumen. Die Gesamtmenge an produziertem Glycerin ist in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Folgende Tabelle gibt das Marktvolumen von Glycerin wieder (HEMING 1999).

Tabelle 3-1: Glycerinherkunft und –mengen in den Jahren 1992, 1995 und 1998.

Herkunft des Glycerins	Glycerinaufkommen, weltweit [t]			
	Jahr	1992	1995	1998*)
1. Seifenherstellung		208.000	210.000	199.000
2. Fettsäuregewinnung		268.000	286.000	304.000
3. Fettalkoholgewinnung, Umesterung				
a. Fettalkoholgewinnung		78.000	99.000	109.000
b. Biodieselherstellung		6.000	40.000	55.000
c. Produktion von Fettersatzstoffen		-	-	3.000
d. sonstige		-	15.000	20.000
4. Synthese		78.000	80.000	95.000
5. Fermentative Herstellung		-	-	15.000
Summe:		638.000	730.000	800.000

*) geschätzte Werte (HEMING 1999)

Die Zahlen spiegeln die Dynamik des Glycerinmarktes wider. Rückgänge bei der Seifenproduktion wurden mehr als kompensiert durch die Herstellung von Fettalkoholen- und –säuren. Zunehmend wichtiger wird dabei der Beitrag der Biodieselherstellung. Vor dem Hintergrund steigender Rohölpreise (Tecson 2000) werden die Produktionskapazitäten ausgebaut. Auch neue Produkte wie etwa Fettersatzstoffe werden an Bedeutung gewinnen. Olean[®] von Procter&Gamble wurde in den USA bereits zugelassen. Trotz der im angegebenen Zeitraum drastisch gesunkenen Preise wird sogar vermehrt Glycerin synthetisiert oder fermentativ hergestellt - beispielsweise bei Archer-Daniels-Midland (ADM) in Cedar Rapids, USA auf Basis von Maisstärke (FORD 1997).

Eine Reihe von Arbeiten beschäftigt sich mit der Fermentation von Kohlenhydraten zu Glycerin (BISPING *et al.* 1990, COMPAGNO *et al.* 1996, GONZÁLEZ-BENITO *et al.* 1994, VIJAKISHORE und KARANTH 1984). Neben der *direkten* Fermentation kann auch Glycerin, das bei der Herstellung von Ethanol durch Hefen gebildet wird, aus der Fermentationsbrühe gewonnen werden. Bei der High Plains Corporation (Wichita, KS, USA) soll nach Mikrofiltration das Glycerin mittels Ionenausschlusschromatographie aufgereinigt werden (SMITH 2000). Die angestrebte Jahresproduktion und mögliche Glycerinpreise zu diesem Prozess sind leider nicht bekannt.

Die Hauptbereiche für die Verwendung von Glycerin waren 1997: Kosmetik (16,1 %), Polyole (11,7 %), Ester (10,7 %), Pharmazeutika (9,8 %) und Nahrungsmittel (8,5 %). Für die Verwendung im Nahrungsmittel-, Kosmetik- und Pharmabereich wird dabei aufgrund der BSE Problematik zunehmend Glycerin pflanzlichen Ursprungs benötigt.

Abbildung 3-3 zeigt die Preisentwicklung für Pharmaglycerin in Europa in den vergangenen 20 Jahren. Man erkennt die starken Schwankungen, denen der Glycerinpreis unterworfen war. Es steht zu erwarten, dass diese Schwankungen weiterhin stattfinden. Daher erklärt sich das Interesse von Firmen, in deren Prozessen Glycerin als Abfallprodukt anfällt, sich durch eine Veredelung des Glycerins von diesen Schwankungen abzukoppeln.

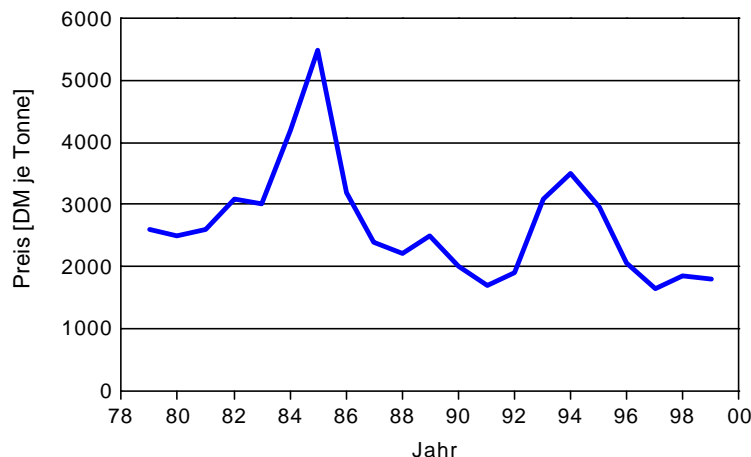


Abbildung 3-3 Preisentwicklung in Europa für Glycerin in Pharmaqualität für 1979-99, Reinheit 99,5 % (HEMING 1999).

Abbildung 3-4 zeigt die Entwicklung des Glycerinpreises für verschiedene Qualitäten am Handelsplatz Rotterdam über die letzten fünf Jahre.

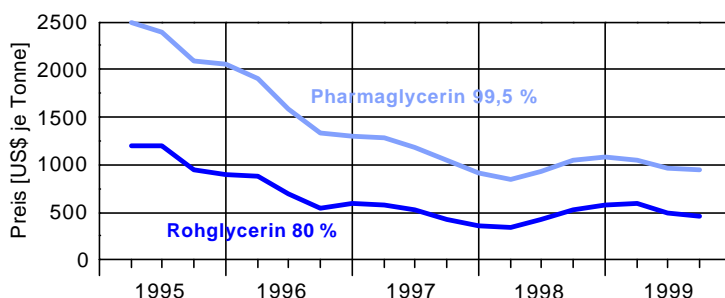


Abbildung 3-4: Entwicklung des Glycerinpreises in Rotterdam für verschiedene Qualitäten 1995 bis 1999 (HBI 1999).

Auf Grundlage eines Dollarkurses im Bereich von 1,90 DM je US\$ lag demnach Ende 1999 der Glycerinpreis bei etwa 1,79 DM je kg Glycerin für Pharmaglycerin und 1,07 DM je kg Glycerin für Rohglycerin mit einem Gehalt von 80 %. Wie bereits in Abschnitt 3.1 erwähnt, spielen die Rohstoffkosten eine sehr wichtige Rolle. Liegen sie im Bereich von anderthalb bis zwei DM je Kilogramm PD sind sie wahrscheinlich zu hoch, um das Diol zu konkurrenzfähigen Preisen her-

stellen zu können. Ein anderes Bild ergibt sich, wenn sehr kostengünstige Rohglycerinabläufe mit Glycerinkonzentrationen im Bereich von 5 bis 50 % *direkt* aus Fettspaltungs- oder Umesterungsanlagen als Rohstoffquelle verwendet werden. Da solche gering konzentrierten Glycerinwässer praktisch nicht aufkonzentriert gehandelt werden, sind konkrete Preise für solche Glycerinchargen kaum in Erfahrung zu bringen. Nach persönlicher Mitteilung verschiedener Experten aus dem Bereich der oleochemischen Industrie dürften die Preise jedoch im Bereich von 500 DM je t Glycerin oder gar darunter liegen.

Mikrobielle Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol

Eine Reihe von Mikroorganismen ist in der Lage Glycerin zu verwerten und unter anaeroben Bedingungen 1,3-Propandiol zu bilden. Eine Übersicht über die verschiedenen Bakterienarten und –gattungen gibt WITTLICH 1996. Die aufgrund ihrer Produktivität sowie Produkt- und Glycerintoleranz für eine technische Nutzung infrage kommenden Bakterienstämme beschränken sich dabei auf die Gattungen *Citrobacter*, *Klebsiella* und *Clostridium*. Mikroorganismen der beiden erstgenannten Gattungen gehören zu den Enterobacteriaceen. Diese sind im Gegensatz zu Clostridien fakultativ anaerob und somit nicht sauerstoffempfindlich, jedoch sind sie der mikrobiologischen Risikoklasse L2 zugeordnet. Dagegen gehört der PD bildende Stamm *C. butyricum* zur niedrigsten mikrobiologischen Risikoklasse L1 (BG Chemie 1998).

Die Wege des anaeroben Glycerinstoffwechsels und die beteiligten Enzyme wurden im wesentlichen an Enterobakterien untersucht (AHRENS *et al.* 1998, FORAGE und FORSTER 1982, NEIJSSSEL *et al.* 1975, RUCH *et al.* 1974, STREEKSTRA *et al.* 1987, ZENG *et al.* 1993). Daneben gibt es jedoch zunehmend Untersuchungen zum Glycerinstoffwechsel der Clostridien (JUNG *et al.* 2000, ZENG *et al.* 1996). Abbildung 3-5 zeigt die Wege des anaeroben Glycerinstoffwechsels von *C. butyricum*.

Nutzung von Kohlenhydraten

Marktvolumen und -situation

Das Marktvolumen von Kohlenhydraten, wie etwa Saccharose, Glucose oder Stärke, bewegt sich auf erheblich höherem Niveau als das von Glycerin. Die weltweit erzeugte Menge an Rohzucker betrug 1998/99 etwa 128,3 Mio t mit steigender Tendenz. Der Weltmarktpreis für Rohzucker schwankte in den Jahren 1987 bis 1998 zwischen etwa 200 und 600 DM je t (Wirtschaftliche Vereinigung Zucker 2001). Anfang 2000 lag der Preis bei etwa 250 DM je t.

Neben der Nutzung von Saccharose ist auch die Nutzung von Glucose oder Glucosesirup aus Maisstärke denkbar. Der Preis für die Glucose ist zeitweise so niedrig, dass wie oben erwähnt sogar die Herstellung von Glycerin wirtschaftlich ist (FORD 1997).

Umsetzung durch natürliche Mikroorganismen

Es sind keine natürlichen Organismen bekannt, die auf Basis von Kohlenhydraten 1,3-Propandiol bilden (CAMERON 1998). Somit müsste ein Konversionsprozess immer mehrere Mikroorganismen nutzen. Hefen können aus Glucose Glycerin herstellen (vgl. 3.1.2). Nachfolgend wird das Glycerin von einem anderen Mikroorganismus zu 1,3-Propandiol umgesetzt. Natürlich ist bei dieser Vorgehensweise die Abstimmung der beiden aufeinanderfolgenden Schritte schwierig und die erreichbare PD-Ausbeute muss auf die eingesetzte Glucose bezogen werden. Zudem ist fraglich, ob beide Schritte simultan erfolgen können oder ob ein zweistufiger Prozess erforderlich ist und eventuell sogar eine zwischenzeitliche Aufreinigung oder Aufkonzentrierung des Glycerins erfolgen muss.

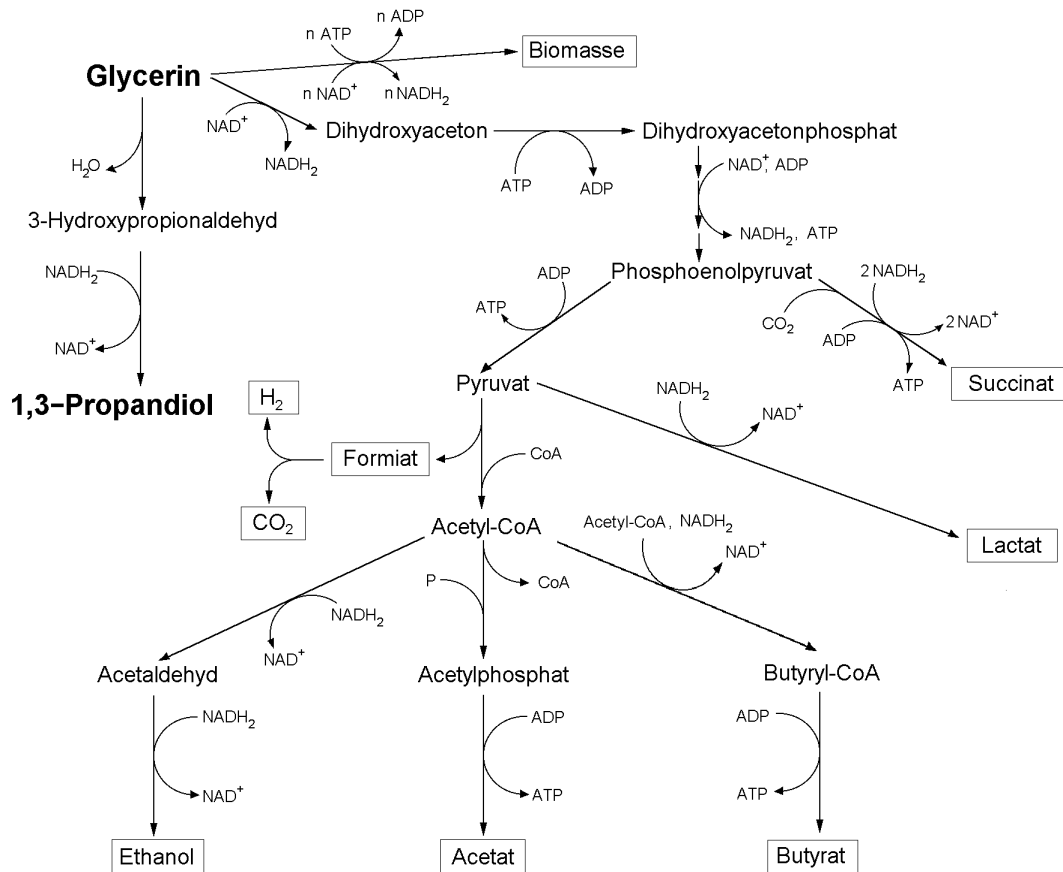


Abbildung 3-5: Glycerinstoffwechsel von *Clostridium butyricum* nach ZENG 1996. Die neben 1,3-Propandiol gebildeten Substanzen sind jeweils umrahmt.

Umsetzung durch gentechnisch veränderte Organismen (GVO)

Ziel eines von Dupont in Zusammenarbeit mit Genencor vorangetriebenen Projektes ist die Entwicklung eines gentechnisch veränderten Mikroorganismus, der alle Enzyme besitzt, Glucose direkt zu 1,3-Propandiol umzuwandeln. Offenbar sollen verschiedene, für die PD-Synthese benötigte Enzyme und Eigenschaften in eine Glycerin bildende Hefe kloniert werden. Über konkrete Ergebnisse dieser Forschungsarbeiten ist aus verständlichen Gründen bislang nur wenig bekannt geworden. In Firmeninformationen von Dupont wird jedoch angegeben, dass der Fortschritt der Entwicklungsarbeit über den Erwartungen liegt und dass ein zur chemisch-synthetischen Herstellung konkurrenzfähiges Verfahren in naher Zukunft möglich ist (Dupont 1999). Der entsprechende Stamm ist bereits von Dupont und Genencor in einer Reihe von Patenten geschützt worden.

Nutzung von Glycerin mit Kohlenhydraten als Co-Substrat

Ein Weg, kostengünstige Kohlenhydrate indirekt für die Herstellung von PD zu nutzen, ist ihr Einsatz als Co-Substrat in einer Fermentation zusammen mit Glycerin. Denkbar ist, dass beispielsweise Saccharose oder Glucose über die Glykolyse in die üblichen Gärungsprodukte sowie Biomasse umgesetzt werden. Die dabei verbrauchten Reduktionsäquivalente (NADH^+) können bei Reduktion von Glycerin zu 1,3-Propandiol regeneriert werden und es kann theoretisch die gesamte Menge an Glycerin zu PD umgesetzt werden. Die molare Ausbeute für PD könnte so bis zu 1,00 betragen. Bei verschiedenen *Lactobacillus* Stämmen ist eine Bildung von PD aus

Glycerin praktisch nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von Glucose möglich (SCHÜTZ und RADLER 1984).

Auch bei *Clostridium butyricum* wurde eine simultane Nutzung von Glycerin und Glucose beobachtet. Während für *C. butyricum* VPI 3266 praktisch keine Erhöhung von Y_{PD} beobachtet wurde (SAINT-AMANS und SOUCAILLE 1995), konnte für *C. butyricum* DSM 5431 eine erhebliche Steigerung erreicht werden, wenn Medium mit Glycerin und Glucose verwendet wurde (ABBAD-ANDALOUSSI *et al.* 1998, BIEBL und MARTEN 1995).

Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen

Neben Glycerin und Kohlenhydraten ist auch die Nutzung von CO_2 als Grundlage für die PD-Bildung denkbar. Verschiedene Arten der halophilen Alge *Dunaliella* bilden zur Regulation des osmotischen Druckes intrazellulär Glycerin (BEN-AMOTZ und AVRON 1973). Die Regulation der Glycerinsynthese (CHITLARU und PICK 1991) und die extrazellulären Einflüsse, die zur Freisetzung des Glycerins in das umgebende Medium führen, wurden untersucht. Hier sind zu nennen eine niedrige Ca^{2+} -Konzentration des Mediums, eine Temperaturerhöhung (FUJII 1994, WEGMANN *et al.* 1980) oder die osmotischen Verhältnisse von innen zu außen (FUJII und HELLEBUST 1992). Trotz der bislang erreichten niedrigen Glycerinkonzentrationen von weniger als $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ wurden bereits sehr früh Untersuchungen zur direkten Umsetzung der glycerinhaltigen Algenkultur mit Bakterien zur Lösungsmittelproduktion durchgeführt. NAKAS erzielte mit stark aufkonzentrierten Algenkulturen bei der nachfolgenden Umsetzung mit *Clostridium pasteurianum* bis zu $2,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PD (NAKAS *et al.* 1983).

3.1.3 *Clostridium butyricum*

Die anaerobe Glycerinumsetzung durch *Clostridium butyricum*

Bereits im Jahre 1924 wurde die Umsetzung von Glycerin zu 1,3-Propandiol durch Clostridien – damals noch der Stamm *Bacillus welchii* – von HUMPHREYS beschrieben. (HUMPHREYS 1924). Jedoch wurde erst in den achtziger Jahren das Interesse an dieser Eigenschaft der Clostridien wiederentdeckt. Hierbei standen unterschiedliche Zielrichtungen im Vordergrund. Neben Arbeiten zur Verbreitung der PD-Bildung innerhalb der Gattung der Clostridien (FORSBERG 1987), wurden zunehmend Untersuchungen durchgeführt, die in Richtung einer technischen Nutzung der Clostridien für ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von PD zielen: Arbeiten zu Produktinhibierung von *C. butyricum* (BIEBL 1991), zum Stoffwechsel und den beteiligten Enzymen (DABROCK *et al.* 1992, HEYNDRIX 1991, SOLOMON *et al.* 1995, ZENG *et al.* 1996), zur gezielten Erhöhung der PD-Ausbeute durch Limitierung (REIMANN A *et al.* 1996) und zum Screening nach neuen PD bildenden Clostridienstämmen (BIEBL *et al.* 1992) wurden durchgeführt. Die Untersuchungen zur parallelen Verwertung von Glycerin und Co-Substraten, z.B. Glucose, durch Clostridien wurden bereits im Kapitel zur Nutzung von Kohlenhydraten erwähnt.

Eine Reihe von Arbeiten beschäftigt sich direkt mit der Entwicklung eines Fermentationsprozesses zur Herstellung von PD mit *C. butyricum*. Schon Ende der achtziger Jahre wurden in der Arbeitsgruppe von DECKWER Untersuchungen zum *up-scaling* von *batch*-Fermentationen in verschiedenen Reaktortypen durchgeführt (GÜNZEL 1991, GÜNZEL *et al.* 1991). Einfache Strategien für die Steuerung von *fed-batch*-Fermentationen anhand der gebildeten CO_2 - oder Säuremenge wurden untersucht (GROTHE *et al.* 2000, SAINT-AMANS *et al.* 1994). Verschiedene Ansätze wurden und werden verfolgt, um die Konkurrenzfähigkeit der mikrobiellen PD-Herstellung zu erhöhen. Zu nennen sind hier Arbeiten zur Nutzung kostengünstiger Rohglycerine, vor allem aus der Biodieselherstellung (GÜNZEL 1991, PAPANIKOLAOU *et al.* 2000, PETITDEMANGE *et al.*

1995). Daneben wurden Versuche unternommen, die Produktivität durch Erhöhung der Biomasse im Reaktor durch Aufkonzentrierung zu erhöhen (REIMANN A *et al.* 1998b) und die Produkttoleranz von *C. butyricum* zu erhöhen (ABBAD-ANDALOUSSI *et al.* 1995, REIMANN A *et al.* 1998a).

Parallel dazu wird nach neuen PD bildenden Clostridienstämmen gesucht (PAPANIKOLAOU *et al.* 2000) und versucht, das Kultivierungsmedium zu optimieren (HIMMI *et al.* 1999).

12 Sauerstoffempfindlichkeit, Sporulation und Trocknung von *C. butyricum*

Sauerstoffeinfluss

C. butyricum gilt als strikt anaerober Stamm. Leider gibt es nur wenige und meist mäßig quantitative Aussagen über die Sauerstoffverträglichkeit dieser Zellen, wie beispielsweise Zeitangaben oder verträgliche Sauerstoffkonzentrationen. Zu viele Einflüsse durch Parameter wie etwa das benutzte Medium, die Wachstumsphase und Vorgeschichte der Kultur oder der experimentelle Aufbau machen es schwierig, generelle Aussagen zu treffen.

FREDETTE *et al.* (1967) finden für *C. butyricum* immobilisiert in Agar und kultiviert in normaler Atmosphäre kein Wachstum bis in eine Tiefe von 8 mm. Werden weniger Zellen immobilisiert, vergrößert sich die zellfreie Zone leicht. Bei Erhöhen des O₂-Partialdrucks durch Kultivierung unter 1 bzw. 2 bar Überdruck mit reinem O₂ vergrößert sich die Zone auf 16 bzw. 18 mm.

Die gleichen Autoren beschreiben *C. sporogenes* als geringfügig toleranter gegenüber Sauerstoff als *C. butyricum*. MORRIS und O'BRIEN (1971) geben für diesen Clostridienstamm eine O₂-Konzentration von 2,5 bis 4,8 % als limitierend an, abhängig von der Versuchsdurchführung und dem benutzten Medium.

STOLP (1955) findet bei einer auf komplexem Medium gewachsenen Kultur von *C. butyricum* nach einer vorübergehenden Luftbegasung von 6 Stunden ein erneutes Wachstum der Zellen nachdem das Redoxpotenzial wieder auf den ursprünglichen Wert gesunken ist. Es muss beachtet werden, dass überdauernde Sporen für das erneute Wachstum verantwortlich sein können. Des weiteren muss schon hier auf einen grundlegenden Unterschied bei den Erfordernissen von suspendierten und immobilisierten Zellen hingewiesen werden: Eine Kultur freier Zellen kann sich auch beim Überleben nur weniger Zellen vollständig regenerieren. Dahingegen fällt beim Absterben einzelner fixierter Zellen in einer Gelstruktur deren Immobilisationsort als Ausgangspunkt für eine Kolonie weg, d.h. durch die Überlebensrate beim Immobilisieren werden das spätere Koloniemuster und die erreichbare Biomassemenge erheblich beeinflusst.

MORRIS und O'BRIEN (1971) nennen eine große Zahl widersprüchlicher Ergebnisse zur Frage, ob ein zu hohes Redoxpotenzial oder die Anwesenheit von Sauerstoff für die Inhibierung der Clostridien verantwortlich ist. Experimente mit verschiedenen Substanzen, die die beiden Größen unabhängig voneinander beeinflussen, stützen sowohl die eine als auch die andere Hypothese (KLIGLER und GUGGENHEIM 1938, KNAYSI und DUTSKY 1936). Neben Ascorbinsäure werden eine Reihe weiterer, meist reduzierender Substanzen vorgeschlagen, um ein „aerobes Wachstum“ zu ermöglichen, wie beispielsweise Thioglykolat oder Glutathion (QUASTEL und STEPHENSON 1924), Dithiothreitol (MOORE 1968), Ferricyanide (KNAYSI und DUTSKY 1936) oder gar poröse Substanzen wie etwa Asbest, Aktivkohle oder Kork (DOUGLAS *et al.* 1917).

Sporulation

Bei Clostridien handelt es sich um anaerobe Endosporenbildner (vgl. 4.1). Die sehr proteinreichen Endosporen zeichnen sich vor allem durch eine enorme Hitzestabilität aus (SCHLEGEL 1986). Dies ermöglicht zum einen die einfache Aufreinigung von Clostridien aus Mischkulturen mittels Pasteurisierung, d.h. kurzzeitiges Erhitzen auf Temperaturen von 60 bis 80 °C. Zum

anderen sind Endosporen - oder Sporen allgemein - der Grund für die aufwändige Steriltechnik, die Temperaturen weit über 100 °C gewährleisten muss.

Durch die Bildung von Endosporen können Clostridien häufig neben hohen Temperaturen auch andere lebensfeindliche Stresssituationen überdauern, wie etwa Sauerstoff, Nährstoffmangel, toxische Substanzen oder UV-Strahlung (SCHLEGEL 1986, WOODS und JONES 1986).

Bei vielen Arbeiten zur Immobilisierung von *C. acetobutylicum* wurden Sporen eingesetzt, die durch spezielle Vorkultivierung (HÄGGSTRÖM und MOLIN 1980) gewonnen und durch kurzzeitige Hitzebehandlung nach der Immobilisierung aktiviert werden (FÖRBERG *et al.* 1983, HÄGGSTRÖM 1981, HÄGGSTRÖM und MOLIN 1980, REARDON und BAILEY 1988). Offenbar soll die allgemein größere Robustheit der Sporen für die Immobilisierungsprozedur ausgenutzt werden. Eine erhöhter Anteil von Sporen an der zu immobilisierenden Biomasse ist also wünschenswert.

Eine große Zahl von Arbeiten beschäftigt sich mit der Frage der Ursache und der gezielten Induktion der Sporenbildung (WOODS und JONES 1986). Ähnlich wie bei der Frage der Sauerstofftoleranz der Clostridien gibt es auch bei der Erforschung der Sporenbildung nur wenige generelle Aussagen oder Angaben, die sich gezielt auf *Clostridium butyricum* beziehen. Eine verbreitete Anforderung für verstärkte Sporenbildung scheint ein Medium zu sein, das ein verlangsamtes Wachstum bedingt. Für diese Wachstumsverlangsamung werden verschiedene Möglichkeiten vorgeschlagen. Häufig wird eine verhältnismäßig nur langsam verwertbare C-Quelle eingesetzt, wie etwa Stärke. Teilweise hemmt ein hoher Glucosegehalt die Sporulation, bei *C. butyricum* scheint dies jedoch nicht der Fall zu sein (BERGÈRE und HERMIER 1965). Auch ein gebremstes Wachstum durch Zusatz chemischer Substanzen wie etwa Theophyllin oder Koffein wird vorgeschlagen (SACKS 1983).

Ein Mangel an Nährstoffen wurde häufig als Auslöser für die Sporulation angenommen. Verschiedene Arbeiten zeigten jedoch, dass für Clostridien während der gesamten Sporulation eine C- und Energiequelle vorhanden sein muss (HICKEY und JOHNSON 1981, MURELL 1967) und der Mangel an einem Nährstoff nicht für das Auslösen der Sporulation in *C. butyricum* verantwortlich ist (BERGÈRE und HERMIER 1965).

Auch die Art und Menge der Stickstoffquelle hat einen Einfluss auf die Sporulation. Für verschiedene Spezies der Clostridien sind Details der richtigen Medienzusammensetzung für die Induktion der Sporulation bekannt (FRANK und LUM 1969, SACKS und THOMPSON 1978). Während viele Clostridien organische N-Quellen nutzen sind die saccharolytischen, Buttersäure bildenden Arten in der Lage, mit anorganischem Stickstoff in Form von z.B. Ammonium zu wachsen. PERKINS empfiehlt für diese Spezies zur Steigerung der Sporulation den Gehalt an organischem Stickstoff niedrig zu halten (PERKINS 1965). Ob während der Sporulation Stickstoff benötigt wird ist unklar. Ein Voraussetzung für die Ausbildung hitzeresistenter Sporen wird im ausreichenden Vorhandensein von Calcium gesehen (SACKS und THOMPSON 1978).

Möglichkeiten, die Sporulation durch die Wachstumstemperatur zu fördern, sind gering (ROBERTS 1967). Die optimale Wachstumstemperatur ist häufig auch die optimale Temperatur für die Sporulation. Höhere Temperaturen wirken sich hingegen eher negativ auf die Sporulationshäufigkeit aus (LABBE und DUNCAN 1974, LABBE und TANG 1983, LONG 1984).

Der pH-Wert gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase von Clostridien spielt eine große Rolle bei der Sporulation. Fällt in einer *batch*-Kultur der pH-Wert durch zu geringe Pufferung auf unter 5, so ist die Sporulationsfähigkeit von saccharolytischen, Buttersäure bildenden Clostridien stark eingeschränkt (BERGÈRE und HERMIER 1965, COLLIER 1957, LONG *et al.* 1983,

LONG *et al.* 1984). Der optimale pH-Wert für die Sporulation dieser Clostridienarten liegt im Bereich von 5,0 bis 5,8.

Bezüglich des Einflusses von zutretendem O₂ auf die Sporulation sind nur sehr wenige Untersuchungen gemacht worden. Für *C. acetobutylicum* P262 konnte LONG in einem komplexen Medium eine verstärkte Sporulation nach Luftbegasung feststellen (LONG 1984).

Insgesamt zeigen die Arbeiten, dass die Sporulation vom komplexen Zusammenwirken verschiedenster Faktoren abhängt. Es lassen sich wie erwähnt nur wenige generelle Aussagen treffen, die zudem natürlich nicht zwingend für einzelne Bakterienstämme zutreffen müssen.

Für die Quantifizierung der Sporen werden vor allem die Auszählung unter dem Mikroskop sowie Ausplattierungsverfahren nach Pasteurisierung der fraglichen Kultur empfohlen. Letzteres ist natürlich insbesondere dann von Nutzen, wenn es darum geht, fertige hitzeresistente Sporen zu quantifizieren. Dahingegen eignet sich die direkte Zählung vor allem als schnelle Routinebestimmung.

Trocknung

Auch über die Trocknung von Clostridien und die Resistenz der Endosporen von Clostridien gegenüber dem Austrocknen ist wenig bekannt. Die meisten Arbeiten beschäftigen sich dabei mit der pathogenen Art *Clostridium botulinum* und deren Überdauern in Lebensmitteln bei geringem pH-Wert oder bei geringer Wasseraktivität aufgrund hoher Salzkonzentrationen (DODDS 1989, GLASS und DOYLE 1991, MCCURE *et al.* 1994). Es steht jedoch zu vermuten, dass die Sporen eine recht gute Toleranz gegenüber dem Austrocknen aufweisen, da ihr Wassergehalt mit etwa 15 % erheblich unterhalb dessen von vegetativen Zellen liegt. KOIKE *et al.* fanden bei Trocknung von Zellsuspensionen bei –196 °C und $1,3 \times 10^{-8}$ mbar zwar 55 bzw. 75 % überlebende Sporen für *Bacillus subtilis* bzw. *Clostridium manganoti*. Hingegen überlebten *E.coli* und *Halobacterium* diese Prozedur nicht.

3.1.4 Thermophile Mikroorganismen

Zwar ist die Existenz thermophiler Mikroorganismen schon seit vielen Jahren bekannt (SCHARDINGER 1903), doch wurden ihre Vielfalt und ihr Wert für die moderne Biotechnologie erst recht spät in der Folge der Forschungstätigkeit von THOMAS D. BROCK im Yellowstone National Park (Wyoming, USA) Ende der 60er Jahre erkannt (Yellowstone National Park 2000). Ein von BROCK isolierter Thermophilenstamm, *Thermus aquaticus* YT-1, ist mit der aus ihm isolierten DNA-Polymerase zur Grundlage der *polymerase chain reaction* (PCR) geworden und hat damit die rasante Entwicklung der Gentechnik ermöglicht.

Definition

Eine exakte Definition und damit Abgrenzung von „Thermophilen Mikroorganismen“ ist schwierig. MADIGAN empfiehlt für Mikroorganismen eine Einteilung nach Maßgabe der jeweiligen Minimal-, Optimal- sowie Maximaltemperatur für das Wachstum der Zellen. Für Bakterien mit einem Temperaturoptimum oberhalb von 45 °C verwendet er den Begriff „thermophil“, bei solchen mit einem Optimum oberhalb von 80 °C spricht er von „hyperthermophilen“ Bakterien (MADIGAN *et al.* 2000). Der Bereich der Thermophilen wird fast ausschließlich durch Eu- und Archaeobakterien abgedeckt. Es sind praktisch keine vielzelligen Organismen bekannt, die unter diesen Bedingungen optimal lebensfähig sind. Unter den Eukaryonten sind lediglich wenige Protozoen zum Wachstum bis knapp oberhalb von 50 °C sowie wenige Pilze und einzellige Algen zum

Wachstum bis zu 60 °C befähigt. Höhere Temperaturen werden also nur noch von prokaryontischen Mikroorganismen toleriert (GOTTSCHAL und PRINS 1991).

Vorkommen thermophiler Mikroorganismen

Die Existenz von Standorten mit erhöhter Temperatur ist in der Natur verhältnismäßig selten, verglichen mit psychrophilen oder mesophilen Bereichen. Die Zahl der Habitate, die durch Sonneneinstrahlung dauerhaft echte thermophile Bedingungen bieten ist gering. Häufiger sind künstliche, d.h. anthropogene Standorte, wie beispielsweise sich selbst erhitzende Materialien wie etwa Abfall, Kompost oder Silage. Daneben können auch industrielle Anlagen oder Kraftwerke in bestimmten Bereichen optimale Wachstumsbedingungen für thermophile Mikroorganismen bieten (GOTTSCHAL und PRINS 1991).

Die eindrucksvollsten und wohl vielfältigsten thermophilen Biotope der Natur entstehen durch vulkanische Phänomene im weitesten Sinne. Hier sind in erster Linie heiße Quellen, heiße Schlammtümpel und Seen oder geothermisch erwärmte Böden zu nennen. Spektakulär sind daneben die sogenannten *black smoker*. Das sind unterseeische Krater, durch die eingedrungenes Wasser mit hoher Temperatur mit Mineralien angereichert austritt. Bedingt durch den hohen Umgebungsdruck ist das Wasser auch bei Temperaturen teilweise weit oberhalb von 100 °C flüssig – eine Grundvoraussetzung für mikrobiologisches Leben.

Thermophile Standorte vulkanischen Ursprungs sind praktisch überall auf der Erde anzutreffen. Sie konzentrieren sich aber hauptsächlich auf den westlichen Teil der Vereinigten Staaten, Neuseeland, Island, Japan, Indonesien und auf die mediterrane Region, insbesondere Italien. Das Gebiet, das am reichsten an heißen Quellen ist, ist der Yellowstone National Park in den USA. Mit einer Anzahl von etwa 10.000 beherbergt er mehr heiße Quellen und vergleichbare geothermale Phänomene als der Rest der Welt zusammen. Das hier vermutete gewaltige genetische Potenzial der thermophilen MO wird durch einen Vertrag zwischen dem Nationalpark und der US amerikanischen Firma Diversa gesichert. Bei dem am 17. August 1997 geschlossenen Abkommen handelt es sich um den ersten Vertrag in den USA, der die „biologischen Schürfrechte“, das sogenannte *bioprospecting*, regelt oder besser gesagt vermarktet (Yellowstone National Park 2000). Die Temperatur vieler Quellen im Yellowstone National Park ist recht konstant, da das Wasser häufig siedet - abhängig von der Höhenlage bei unterschiedlicher Temperatur. Es finden sich Quellen über den gesamten Temperaturbereich, da das Wasser meist kontinuierlich abfließt, allmählich abkühlt und dann einen Temperaturgradienten bildet (MADIGAN *et al.* 2000).

Leben bei hohen Temperaturen

Eine Grundvoraussetzung für das Wachstum von Mikroorganismen unter aus unserer Sicht extremen Temperaturbedingungen ist die intakte Struktur und damit Funktion aller lebenswichtigen Zellbestandteile wie Proteine, Nukleinsäuren oder Zellmembranen.

Die Thermostabilität der Proteine, insbesondere der Enzyme, wird auf das Vorhandensein bestimmter Aminosäuren an wichtigen Stellen in der Proteinstruktur zurückgeführt. Insgesamt sind es meist nur marginale Änderungen in der Struktur, die die erhöhte Stabilität bedingen. Meist ist die Zahl der Salzbrücken erhöht und die Proteine weisen zusätzlich ein dichtgepacktes hydrophobes Zentrum auf, das ein Entfalten in wässriger Umgebung erschwert (MADIGAN *et al.* 2000). Mit einer zu starren Struktur geht die für die Funktion eines Enzyms notwendige Flexibilität verloren. Thermophile Enzyme arbeiten daher bei niedriger Temperatur nur relativ langsam.

Bei Nukleinsäuren, z.B. DNA, wird die hohe Temperaturstabilität durch einen erhöhten Anteil modifizierter Nucleotide erreicht (SONNLEITNER 1983). Intakte Zellmembranen liegen in einer

sogenannten flüssig-kristallinen Form vor. Die richtige Fluidität der Membran – bedingt durch ein geeignetes Fettsäuremuster – ist unabdingbar für die Steuerung von lebenswichtigen Transportprozessen und die Aufrechterhaltung von Substanzgradienten. Bei thermophilen MO ist meist der Anteil an gesättigten Fettsäuren erhöht, was durch die bessere Möglichkeit der Anlagerung der Molekülketten zu einer geringeren Fluidität der Lipidmembran führt. (MADIGAN *et al.* 2000). Die Anpassung der Membran auch an extreme Temperatureinflüsse ist nicht außergewöhnlich, da praktisch alle MO in der Lage sind, die Membranfluidität der aktuellen Wachstumstemperatur in einem gewissen Umfang anzupassen – ein Effekt, der homöoviskose Adaptation genannt wird (WIEGEL 1986, SONNLEITNER 1983).

Kultivierung und Fermentation

Thermophile Mikroorganismen sind nicht nur von mikrobiologischem Interesse, sie können auch für biotechnische Anwendungen interessant sein. Prozesse, die bei hohen Temperaturen unter Einsatz thermophiler Biokatalysatoren gefahren werden, bieten verschiedene Vorteile (CANGELLA und WIEGEL 2000, MADIGAN *et al.* 2000, SONNLEITNER 1983):

- Metabolische Aktivität ist stets mit einer Wärmeentwicklung gekoppelt. Insbesondere bei Fermentationen im technischen Maßstab, sprich bei großen Fermentern kann ein hoher Aufwand zur Gegenkühlung vonnöten sein. Bei Verwendung thermophiler Biokatalysatoren wird dieser Aufwand verringert oder entfällt gar. Dies senkt die Prozesskosten und steigert die Wirtschaftlichkeit (KLAPATCH *et al.* 1994).
- Die Reaktionsgeschwindigkeit aller chemischen und biochemischen Reaktionen ist nach ARRHENIUS eine Funktion der Temperatur. Eine Temperaturerhöhung führt zur Steigerung der Umsetzungsrate. Bei biologischen Reaktionen führt nach einer Faustformel, der sogenannten RGT-Regel, eine Steigerung um 10 K zu einer Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit.
- Bei erhöhten Temperaturen sind Transportvorgänge durch eine verbesserte Diffusion erleichtert. Dies betrifft beispielsweise auch den Zustrom von Substraten und Abtransport von Produkten im Bereich des Biokatalysators. Gleichzeitig ist die Löslichkeit von Sauerstoff stark herabgesetzt (CHMIEL und WALITZA 1991, KRAHE *et al.* 1996), was insbesondere für eine anaerobe Kultivierung wertvoll sein kann.
- Die Löslichkeit von schwerlöslichen und damit schlecht zugänglichen Substraten, z.B. Stärke, Cellulose oder Inulin, ist durch Temperaturerhöhung verbessert. Sie ermöglicht eine schnellere Umsetzung. JAHNZ setzt für die Umwandlung von Inulin zu Difruktoseanhydrid III ein thermostabiles Enzym ein (JAHNZ *et al.* 2000).
- Das Kontaminationsrisiko und damit der Aufwand für den Sterilbetrieb ist im Vergleich zu klassischen Bioprozessen im Temperaturbereich von 37 °C erheblich geringer.
- Flüchtige Produkte (z.B. Ethanol) können mit weniger Energieaufwand aus der Fermentationsbrühe gewonnen werden, z.B. durch das Anlegen eines Vakuums an das Kultivierungssystem. Darüber hinaus kann eine mögliche Produktinhibierung vermindert oder gar ausgeschaltet werden (LYND 1989).
- Mikroorganismen mit einem Wachstumsoptimum von 40 bis 55 °C werden generell der Risikogruppe 1 zugeordnet (BG Chemie 1998). MO mit noch höher liegenden Temperaturoptima dürften wohl gleichfalls zu dieser Risikogruppe zählen. Aufwändige Sicherheitsvorkehrungen während Fermentation und *down-stream-processing* sowie eine besondere Behandlung der Fermentationsbrühe sind daher generell nicht notwendig.

Verschiedene Arbeiten beschäftigen sich mit den speziellen Bedingungen und Erfordernissen der Kultivierung und Fermentation von thermophilen Mikroorganismen (CANGELLA und WIEGEL 2000, HOLST *et al.* 1997, ODIBO und ULBRICH-HOFMANN 1996).

Aktuelle technische Nutzung thermophiler Biokatalysatoren

In einer Reihe von biotechnischen Prozessen ist der Einsatz von thermophilen Biokatalysatoren mehr oder weniger etabliert. Einen sehr guten Überblick über die biotechnische Nutzung von thermophilen Clostridien geben CANGANELLA und WIEGEL 1993.

3.1.5 Aufarbeitung und Gewinnung des 1,3-Propandiols

Für die Abtrennung des 1,3-Propandiols sind verschiedene Wege denkbar. Hierbei sind in erster Linie thermische Verfahren wie Extraktion, Adsorption und Destillation zu nennen.

Bei der Extraktion soll das PD möglichst selektiv in ein niedrigsiedendes Extraktionsmittel überführt werden, das nachfolgend durch Destillation entfernt wird. Diese Art der Aufreinigung wurde untersucht von MALINOWSKI 1999. Die einfache Extraktion von PD wird hier als wenig vorteilhaft eingestuft. Daher wurden Alternativen untersucht, bei denen vor der Extraktion eine chemische Modifikation des 1,3-Propandiols erfolgt, um die Löslichkeit in einem geeigneten Extraktionsmittel zu erleichtern (MALINOWSKI 2000). Von BROEKHUIS wurde dies auch für die extractive Aufarbeitung von wässrigen 1,2-Propandiollösungen vorgeschlagen (BROEKHUIS *et al.*, 1994, BROEKHUIS *et al.* 1996).

GÜNZEL untersuchte die adsorptive Aufarbeitung mit Hilfe von Zeolithen, sowie Extraktion und Destillation und erzielte gute Ergebnisse mit der destillativen Abtrennung von PD (GÜNZEL 1991). Auch Grothe schlägt eine mehrstufige Destillation vor, um die für die Weiterverarbeitung in der Kunststoffindustrie notwendige Reinheit von >99 % für PD zu erreichen (GROTHE 2000, GROTHE *et al.* 2000).

Die Destillation ist sehr energieaufwändig, da PD mit 214 °C einen deutlich höheren Siedepunkt besitzt als Wasser. Es muss also zunächst eine große Menge Wasser vom Produkt abgetrennt werden. Eine Abschätzung gibt GROTHE *et al.* 2000. Vor diesem Hintergrund wäre eine Aufreinigung in Destillations-/Rektifikationsanlagen kaum wirtschaftlich und ein anderes Trennverfahren für eine neu zu errichtende Anlage wünschenswert. Jedoch muss bedacht werden, dass gerade bei solchen Anlagen, bei denen kostengünstige Rohglycerinwässer in Verseifungs- und Umesterungsprozessen entstehen, vielfach die Anlagen vorhanden sind, um die anfallenden Rohglycerinwässer aufzukonzentrieren, um das Glycerin anschließend überhaupt rentabel transportieren und vermarkten zu können. Diese Anlagen können für die destillative Aufreinigung PD-haltiger Fermentationsbrühen genutzt werden. So kann der hohe Energiebedarf möglicherweise durch geringe Investitionskosten abgedeckt werden.

3.2 Immobilisierte Biokatalysatoren

3.2.1 Definition

Die räumliche Fixierung von Bakterien, Zellen oder Enzymen in Gelpartikel, Kapseln oder auch in umgrenzte Reaktionsräume wird als Immobilisierung bezeichnet (HARTMEIER 1986, VORLOP und KLEIN 1985).

Es sind die verschiedensten Methoden der Immobilisierung beschrieben worden. Nach Hartmeier lassen sie sich in die in Abbildung 3-6 dargestellten Gruppen einordnen (HARTMEIER 1986). Die Immobilisierung führt zu einer Verlagerung der katalytischen Aktivität von submikro-

skopisch und mikroskopisch kleinen Einheiten in makroskopisch fassbare Partikeln, um eine Rückhaltung zu erreichen.

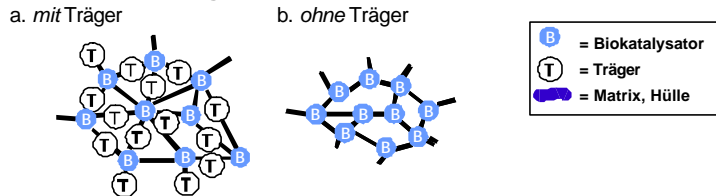
I. Bindung an Oberflächen



Abbildung 3-6: Verschiedene Methoden der Immobilisierung von Biokatalysatoren

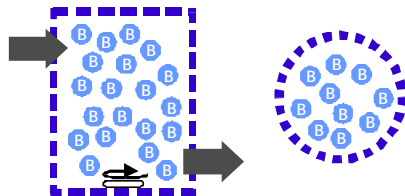
18

II. Quervernetzung



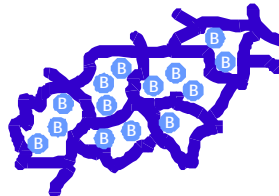
III. Membranabtrennung

a. Membranreaktor b. Hohlkugel



IV. Geleinschluss

a. Membranreaktor



Eine einfache Form der Immobilisierung ist die Bindung eines Biokatalysators an einen Träger (I). Die Adsorption bzw. das Aufwachsen auf den Träger ist zwar sehr schonend für den Biokatalysator. Jedoch ist diese Form der Immobilisierung nicht für alle Katalysatoren geeignet und die Bindung oft nur recht schwach. Ähnliches gilt für die ionische Bindung. Durch eine kovalente Bindung wird zwar eine stabilere Anknüpfung erreicht, doch kann es zu einer Beeinträchtigung der Aktivität des Biokatalysators kommen. Durch Verwendung sehr poröser Materialien lässt sich eine große Bindungsfläche erreichen. Allerdings sind die weiter im Inneren liegenden Biokatalysatoren häufig schlechter mit Substrat versorgt.

Durch Quervernetzung (II) werden ebenfalls vergrößerte Partikeln mit hoher katalytischer Aktivität hergestellt. Entweder wird der Biokatalysator direkt mit sich selbst quervernetzt oder aber über einen geeigneten Träger. Diese Methode ist ungeeignet für lebende Zellen und wird fast ausschließlich für die Immobilisierung von Enzymen oder abgetöteten Zellen mit intaktem Enzymsystem eingesetzt. Auch hier ist eine Schädigung der enzymatischen Aktivität nicht auszuschließen.

Bei der Membranabtrennung (III) wird der Biokatalysator von einer Membran umhüllt. Zu diesen Immobilisierungsmethoden gehören so unterschiedliche Verfahren wie Membranreaktoren und Hohlkugeln. Bei Membranreaktoren werden die Zellen in freier Form in einem mehr oder weniger großen Reaktionsvolumen zurückgehalten und gegebenenfalls aufkonzentriert. Dieses Verfahren ist sehr schonend, da es den Biokatalysator in seiner gewohnten suspendierten Form belässt. Jedoch bedeuten diese Membranreaktoren häufig einen hohen apparativen Aufwand, sind damit kostspielig und nur für hochwertige Anwendungen zu empfehlen, wo andere Verfahren nicht eingesetzt werden können.

Die Verwendung von Hohlkugeln ist demgegenüber vorteilhaft, da die Zellen ebenfalls in suspendierter Form vorliegen, der Aufwand für die Kultivierung jedoch geringer ist als bei Membranreaktoren. Ein Nachteil ist die bei den meisten Verfahren beobachtete geringe Stabilität der

Hohlkugeln. In jüngster Vergangenheit wurden jedoch durch Verwendung geeigneter Polymere hier gute Fortschritte erzielt (ROSE *et al.* 2000).

Eine wichtige Gruppe der Immobilisierungsverfahren ist der Einschluss von Biokatalysatoren, der im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden soll.

3.2.2 Einschlussverfahren

Bei Einschlussverfahren werden Biokatalysatoren in eine Matrix eingebettet, die einen Zutritt von Substraten und das Abfließen der gebildeten Produkte zulässt. Verschiedene Formen der entstehenden Partikel sind denkbar. Die Form wird bestimmt durch die Erfordernisse der späteren Anwendung sowie die mit dem gewünschten Material mögliche Art der Formgebung. Die mit Abstand häufigste Form ist die Kugelform, die sich durch Abtropf- oder Dispergierungsverfahren ergibt. Eine aktuelle Übersicht gibt PRÜSSE 2000.

Eine Vielzahl von Materialien ist für den Einschluss von Biokatalysatoren untersucht worden (VORLOP 1984, VORLOP und KLEIN 1985). Neben synthetischen Polymeren wie etwa Polyurethanen (MUSCAT *et al.* 1993) oder Polyvinylalkohol (PVA) (LOZINSKY *et al.* 1986), sind vor allem natürliche Polymere weit verbreitet. Hier sind in erster Linie Alginat (SMIDSRØD und SKJÅKBRÆK 1990), Agar, Pektin (GEMEINER *et al.* 1991), κ -Carrageenan und Chitosan (VORLOP und KLEIN 1987) zu nennen.

Geleinschlussverfahren eignen sich sehr gut für die Immobilisierung von lebenden Zellen. Vielfach werden die natürlichen Polymere bevorzugt, da man eine gute Verträglichkeit mit dem Biokatalysator erwartet. Dem stehen verschiedene Nachteile gegenüber. So etwa die oft geringe mechanische Stabilität der Immobilisate (MATTIASSON 1983) sowie die biologische Abbaubarkeit, die meist zu einer sterilen Prozessführung zwingt (HAHN-HÄGERDAHL und MATTIASSON 1982, MAIORELLA *et al.* 1984, OHTA *et al.* 1994).

Im Vergleich dazu sind Gele auf Basis von PVA oder Polyurethanen, z.B. Polycarbamoylsulfonat (PCS), mechanisch deutlich stabiler. Eine gute mechanische Stabilität des immobilisierten Biokatalysators ist die Voraussetzung für lange Standzeiten im Fermenter, ohne die sich die Immobilisierung häufig nicht lohnt.

Bei geeigneter Herstellung sind Gele aus synthetischen Polymeren ebenfalls für viele biotechnologische Anwendungen gut geeignet (ARIGA *et al.* 1994, VORLOP *et al.* 1992, VARFOLOMEYEV *et al.* 1990, VORLOP und REMMERS 1990, WILLKE 1992). Zudem sind sie praktisch biologisch nicht abbaubar. Dies bedeutet, dass ein Prozess nicht zwangsläufig steril betrieben werden muss. Nach Einbettung eines Biokatalysators in das Polymernetzwerk eines Hydrogels ist der Biokatalysator von möglichen außerhalb des Gels lebenden Kontaminanten räumlich getrennt. So geschützt, wird durch Einschluss in PVA-Hydrogele sogar oft eine unsterile Prozessführung möglich (WITTLICH 2000). Die Eigenschaften verschiedener Hydrogel-Systeme vergleicht Tabelle 3-2.

Tabelle 3-2: Mechanische Eigenschaften von Hydrogelen auf Basis verschiedener natürlicher und synthetischer Polymere.

Hydrogel, basierend auf Polymer, Konzentration	Elastizitätsmodul [N·mm ⁻²]	Reißdehnung [%]
Natürliche Polymere		
Agar, 5 % (w/w)	0,2	10
κ -Carrageenan, 4 % (w/w)	0,28	27-29
Ca-Alginat, 1 % (w/w)	0,19	55-70

3.2.3 Immobilisierung in Polyvinylalkohol-Hydrogele

Polyvinylalkohol (PVA) wird weltweit mit über 400.000 Tonnen jährlich produziert (FINCH 1992). Bei der Herstellung wird zunächst in Methanol Vinylacetat zu Polyvinylacetat (PVAc) polymerisiert. Nachfolgend wird aus PVAc durch Abspalten der Acetatgruppen Polyvinylalkohol hergestellt (Hoechst 1991). Dies erfolgt entweder durch alkalische Alkoholyse mit Methanol oder durch rein alkalische Hydrolyse in Wasser. Ein wichtiger Unterschied dieser beiden Verfahren sind die in technischen Qualitäten des resultierenden Polyvinylalkohols enthaltenen, aus dem Produktionsprozess stammenden Reststoffe. Bei der Alkoholyse ist dies im wesentlichen Methanol (0,1 bis 0,8 %), bei der alkalischen Hydrolyse vorwiegend Natriumacetat mit bis zu 7 %. Deren mögliche inhibierende Wirkung auf Biokatalysatoren muss bei der Nutzung von technischem PVA berücksichtigt werden. PVA wird vor allem in der Textil- und Papierindustrie, sowie bei der Herstellung von Folien, Klebstoffen, Keramik, Lacken und Farben eingesetzt. Die Preise für Polyvinylalkohole liegen im Bereich von etwa 6 DM je kg (ChemExpo 1998) und damit deutlich niedriger als der von Alginaten mit 50 bis 100 DM je kg. Somit ergibt sich auch bei Berücksichtigung von einzusetzenden 10 % (w/w) PVA gegenüber nur 2 % (w/w) Alginat noch ein Preisfaktor von 2 bis 3.

Es sind verschiedene Methoden zur Bildung von PVA-Hydrogelen beschrieben worden. Die wichtigste ist das sogenannte Kryogelieren (*freezing-thawing*), bei dem durch Einfrieren und nachfolgendes Auftauen stabile Hydrogele erzeugt werden (LOZINSKY *et al.* 1986, VORLOP und REMMERS 1990). Die notwendigen niedrigen Temperaturen von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und darunter sowie die lange Dauer des Immobilisierungsvorganges können zu einer Schädigung insbesondere empfindlicher Mikroorganismen führen. Um dennoch die positiven Eigenschaften von PVA Gelen für die Einschlussimmobilisierung von Biokatalysatoren nutzen zu können, wurde ein Verfahren zur schnellen Herstellung stabiler PVA Gele bei Raumtemperatur entwickelt (JEKEL *et al.* 1998, VORLOP und DING 1995).

3.2.4 Linsenförmige PVA Hydrogelpartikel - LentiKats[®]

Neben der Nutzung von PVA als kostengünstiger sowie mechanisch und biologisch stabiler Gelkomponente weisen LentiKats[®] (Abbildung 3-7) eine Reihe weiterer Vorteile auf.

Synthetische Polymere		
PCS, 10 % (w/w)	0,023	80-120
PVA, kryogeliert, 7 % (w/w)	0,03-0,04	100-240
PVA, geliert bei Raumtemperatur, 10 % (w/w)	0,11	350-450

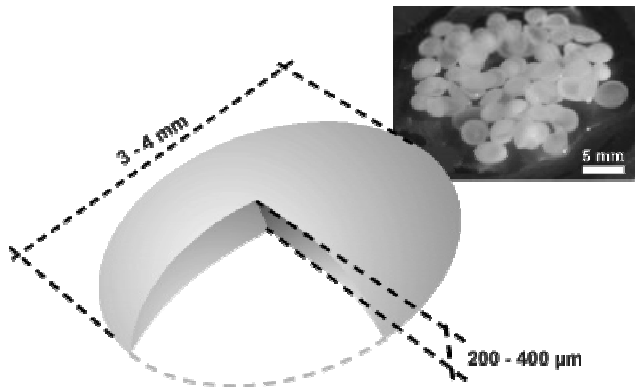


Abbildung 3-7: Skizze eines LentiKats®. Die linsenförmigen Hydrogele auf Basis von PVA besitzen einen Durchmesser von etwa 3 bis 4 mm und eine maximale Dicke von 200 bis 400 µm.

Rechts oben: Foto von LentiKats®

Aufgrund des relativ großen Durchmessers von 3 bis 4 mm sind die Partikel gut mit Hilfe von Lochblechen, Siebplatten oder auch durch einfaches Sedimentieren problemlos von der Fermentationsbrühe abzutrennen. Auch die Rückhaltung in kontinuierlich betriebenen Fermentern ist einfach zu erreichen. Gleichzeitig sind durch die geringe Dicke der Gelscheiben von nur 200 bis 400 µm und den geringen Anteil an Polymerstegen die Diffusionseigenschaften und damit die Versorgung im Inneren des Gels sehr günstig.

Aufgrund der einfachen Herstellung (vgl. 4.6.2), insbesondere durch den geringen Zeitbedarf und die milden Bedingungen, sind LentiKats® sehr gut für die Immobilisierung auch empfindlicher Zellen geeignet.

Für die Entsorgung der PVA Gel-Linsen nach ihrem Einsatz im Biokonversionsprozess müssen zunächst die Hydrogele aufgelöst werden. Dazu kann man sie mit einem Überschuss an Wasser kurzzeitig auf etwa 70 °C erhitzen, was häufig ohnehin zur Inaktivierung der Biomasse erforderlich ist (WILLKE *et al.* 2000). Das gelöste PVA ist anschließend im Abwasser photooxidativ (BAIMURATOV *et al.* 1993), elektrochemisch (KUZNETSOVA *et al.* 1992) oder aber biologisch (LARKING *et al.* 1999, SCHONBERGER *et al.* 1997, YU *et al.* 1996,) abbaubar. Denkbar ist auch eine Rückgewinnung des PVAs nach Abtrennung der Biomasse.

3.2.5 Überlegungen zur Biomasseverteilung im Immobilisat und Begriffsklärung

Die erreichbare spezifische Aktivität von Geleinschlussimmobilisaten, mithin auch von LentiKats®, ist von der Verteilung der aktiven Biomasse im Gel abhängig. Um diesen Einfluss der Kolonienverteilung zu verstehen, sind verschiedene Vorüberlegungen hilfreich.

Begrenzung der Koloniengröße

Die immobilisierten Zellen können sich nicht frei im Gel bewegen. Durch Zellteilung und -wachstum bilden sich an den Stellen, an denen eine Einzelzelle bei der Immobilisierung fixiert wurde, Kolonien und das Gelnetzwerk wird aufgeweitet. Dabei übt das umgebende Gel einen Gegendruck auf die Kolonie und damit die einzelnen Zellen aus.

Unter der Voraussetzung, dass der Faktor, um den eine Gel-Linse durch immobilisierte Zellen gedehnt werden kann, mehr oder minder festgelegt ist, können bei geringer Koloniedichte die einzelnen Kolonien einen größeren Durchmesser erreichen als bei hoher Koloniedichte. Dies wird auch so beobachtet. Eine schlechtere Versorgung bei großer Koloniedichte scheidet als Ursache für den kleinen Koloniedurchmesser aus, da auch nach längerer Inkubationsdauer das gleiche Phänomen beobachtet wird.

Eine Begrenzung des Koloniewachstums durch das Gel ist durchaus wünschenswert, da ansonsten bei fortgesetzter Inkubation alle Kolonien zusammenwüchsen und die für die Versorgung der Biomasse notwendigen Transportwege ins Innere wegfielen.

Biomasseanfangsbeladung

Die Anzahl der Einzelzellen, die in die flüssige PVA-Lösung eingerührt wurden, bestimmt die spätere Kolonienzahl pro Immobilisat. Die Überlebensrate (ÜR) sagt aus, welcher Anteil der Bakterien tatsächlich nach der Immobilisierung Ausgangspunkt einer Kolonie im Gel ist. Die ÜR ist wiederum von den Immobilisierungsbedingungen abhängig.

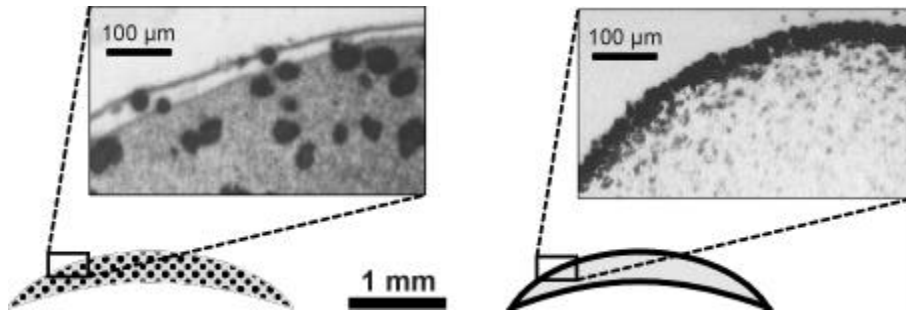





Abbildung 3-8: Querschnitte durch den Randbereich von LentiKats® mit angefärbten Bakterienkolonien und schematische Darstellung. *Links*: niedrige Biomasseanfangsbeladung - geringe Kolonienzahl, daher wenige, jedoch große Kolonien. *Rechts*: hohe Biomasseanfangsbeladung - sehr viele, kleine Kolonien, Ausbildung eines „Schalenkatalysators“.

Wählt man eine niedrige Biomasseanfangsbeladung (BAB), d.h. eine geringe Bakterienkonzentration in der Polymerlösung, so erhält man nach Inkubation der Immobilisate ein Erscheinungsbild, wie es in Abbildung 3-8 links gezeigt ist. Das Gel enthält nur sehr wenige, dafür aber große Kolonien. Obwohl der Biomassegehalt der LentiKats® hoch sein kann, ist die Grenzfläche zwischen Zellen und dem die Kolonien umgebenden Gel gering. Diese Grenzfläche ist jedoch als Austauschfläche der immobilisierten Biomasse für Substrate und Produkte wichtig.

Bei sehr hoher BAB wachsen die Kolonien im Bereich der Oberfläche des Gels rasch zusammen und bilden so eine Schale aus Biomasse (Abbildung 3-8, rechter Teil). Diese „Barriere aus Verbrauchern“ unterbindet weitgehend die Nährstoffversorgung der eingeschlossenen Zellen im Inneren der Gelpartikel.

In beiden geschilderten Grenzfällen ist die spezifische Aktivität der bewachsenen LentiKats® suboptimal, d.h. das Gelvolumen wird nicht ausreichend genutzt - sei es durch die zu geringe Zahl von großen Kolonien mit relativ kleiner Austauschfläche oder sei es durch schlechte Nutzung des innenliegenden Gelvolumens aufgrund der Schalenbildung. Es existiert demnach ein optimaler Bereich für die BAB. Die Betrachtung wird in Tabelle 3-3 verdeutlicht und durch eine einfache Modellrechnung ergänzt.

Tabelle 3-3: Vergleich der Eigenschaften von LentiKats® mit verschiedenen Biomasseanfangsbeladungen (BAB). Der Modellrechnung sind folgende Eckdaten zugrundegelegt: Volumen einer Gel-Linse 4 μL (4 mm^3), Durchmesser 4 mm, zentrale Dicke 0,6 mm, Überlebensrate 10 %.

Aussehen, schematisch			
Biomasse- anfangsbeladung	zu gering	optimale Beladung	zu hoch
Koloniebesatz	sehr große, einzelne Kolonien	viele kleine, einzelne Kolonien	zur Schale zusammen gewachsen
Modellrechnung			
BAB [Zellen $\cdot \text{mL}^{-1}$]	1.000.000	100.000.000	10.000.000.000
Zellen je LentiKat® [-]	4.000	400.000	40.000.000
Kolonien je LentiKat® [-]	400	40.000	4.000.000
Kolonie-Ø [μm]	100	25	100 (Schalendicke)
Volumenanteil*) der Biomasse [%]	5,2	8,2	~ 50
Grenzfläche der Biomasse je LentiKat® [mm^2]	12,5	78,5	26,3 (Oberfläche*)

*) Das Volumen und die Oberfläche eines LentiKats® werden dabei angenähert mit den Formeln für ein Kugel-segment gerechnet.

Die Tabelle macht deutlich, dass eine Reihe von Parametern einen Einfluss auf das Optimum der Biomasseanfangsbeladung hat. Die Geometrie der Gel-Linsen spielt eine wichtige Rolle. Werden die Immobilisate kleiner, sinkt der Anteil des ungenutzten Gels des Schalenkatalysators und das Optimum verschiebt sich in Richtung hoher BAB. Werden die LentiKats® hingegen größer, ermöglicht eine geringe BAB auch das Wachstum im Inneren dieser verhältnismäßig großen Gele, da durch die breiteren Gelstege zwischen den Kolonien Nährstoffe tiefer eindringen können. Wahrscheinlich ist jedoch, dass der Absolutwert der spezifischen Aktivität für solche großen Gel-Linsen geringer ist als für kleinere Immobilisate.

Es ist ratsam, sich auf eine Größe für die Immobilisate festzulegen, die sich gut herstellen und später gut handhaben lässt (Abtrennung, Stabilität) und auf dieser Basis die Optimierung der BAB durchzuführen. Ziel ist eine möglichst hohe absolute spezifische Aktivität bei möglichst geringem Einsatz von Biomasse.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Bakterienstämme und Kulturen

Der für die Experimente verwendete Bakterienstamm *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 wurde von Dr. LAWRENCE NAKAMURA von der *Agricultural Research Service Culture Collection* (Peoria, IL, USA) zur Verfügung gestellt. Der Stamm ist identisch mit *C. butyricum* ATCC 859. Bei *Clostridium butyricum* handelt es sich um die *type species* der Gattung *Clostridium* (HOLT *et al.*, 1994, CUMMINS und JOHNSON 1971). Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024 wurden beispielsweise als potenzieller Buttersäureproduzent untersucht und beschrieben. (SHARPELL und STEGMANN 1980).

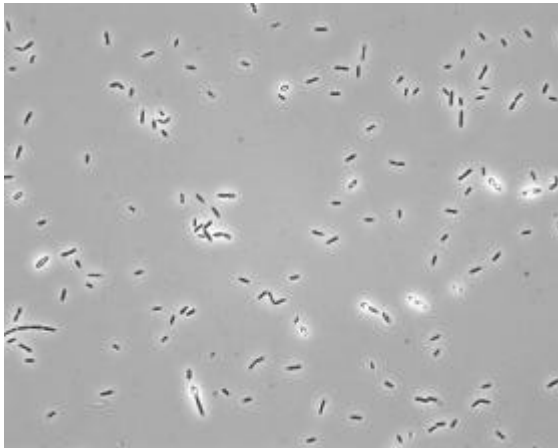
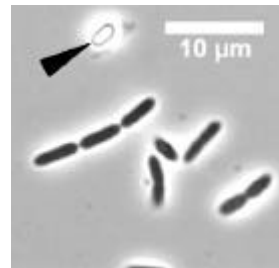


Abbildung 4-1: Mikroskopische Aufnahme einer Reinkultur von *C. butyricum* NRRL B-1024.

links: Übersicht,
unten: Detailaufnahme mit Spore (Pfeil).



In der folgenden Aufstellung sind die wichtigsten Eigenschaften von *C. butyricum* aufgeführt (HOLT *et al.* 1994):

Form und Verhalten	:	stäbchenförmig, beweglich
Länge	:	~ 5 bis 10 µm (pleomorph)
Durchmesser	:	~ 1 bis 2 µm (pleomorph)
Sporen	:	bildet Endosporen
Gramverhalten	:	positiv
O ₂ -Verhältnis	:	strikt anaerob
Stoffwechsel	:	saccharolytisch, keine Sulfatreduktion, keine Katalase- oder Oxidaseaktivität

Auf dem in Abbildung 4-1 gezeigten Foto sind vorwiegend vegetative Zellen und wenige Sporen zu sehen. Daneben treten häufig auch sogenannte *clostridial forms* auf. Das sind vergrößerte, strukturlose, im Mikroskop hell erscheinende Zellen, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Lösungsmittelproduktion spielen (LONG *et al.* 1983).

4.1.1 Beschaffung des Probenmaterials für Screeningversuche mit thermophilen Mikroorganismen

Die Verfügbarkeit geeigneten Probenmaterials ist für ein erfolgreiches Screening unerlässlich. Die Auswahl günstiger Probenstandorte orientierte sich an folgenden Kriterien:

- erhöhte Temperatur, Bereich etwa 55 bis 70 °C
- Auftreten anaerober Bedingungen, zeitweise oder dauerhaft
- Verfügbarkeit von Glycerin oder Fetten und Ölen als Vorstufen

Dabei ist der erste Punkt sicherlich der wichtigste, da die Häufigkeit thermophiler Mikroorganismen an thermophilen Standorten erheblich erhöht ist (WIEGEL 1986). Die beiden weiteren Punkte sind wünschenswert jedoch weniger zwingend, da potenzielle 1,3-Propandiol-Bildner möglicherweise auch andere C-Quellen nutzen können und es sich um nur fakultativ anaerobe Organismen handeln kann.

Für das Screening wurde zunächst auf Probenmaterial aus der näheren Umgebung zurückgegriffen. Später wurde versucht, vielversprechendes Probenmaterial von heißen Standorten vorwiegend aus dem Ausland zu beschaffen und zu bearbeiten. Im Rahmen eines zweiwöchigen Gastaufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. ANTRANIKIAN an der Technischen Universität Hamburg-Harburg wurde das Probenarchiv dieser Arbeitsgruppe nach thermophilen 1,3-Propandiol-Bildnern durchsucht. Hierbei wurde ein einfaches Medium für das Screening nach thermophilen PD-Bildnern entwickelt. Auf der Basis dieses Mediums (Thermophilen-Medium) konnten etwa 60 Bodenproben sowie vorhandene Reinkulturen auf 1,3-Propandiol-Bildungsaktivität untersucht werden.

Nachfolgend wurde ein neuer Weg der Probenbeschaffung beschritten. Im Internet wurde nach heißen Quellen und ähnlichen geothermalen Phänomenen recherchiert und gleichzeitig e-Mail-Adressen von Personen herausgesucht, die in der Nähe dieser vielversprechenden Probenstandorte leben. Die Informationen wurden in der Datenbank „Hotsite“ festgelegt. Im Rahmen der Recherchen wurde eine Reihe von Ländern ermittelt, die bislang weitgehend vom Interesse der Thermophilen-Forschung unberührt geblieben sind. Während die meisten der beschriebenen thermophilen Kulturen aus den USA, aus Italien oder Island stammen, bieten sich auch Länder wie etwa Neuseeland, Japan, Indonesien, Bulgarien, die Slowakei, Nepal, Dominica, Portugal (Azoren) oder die Türkei für die Gewinnung von Probenmaterial an. Via e-Mail wurden Personen gebeten, kleinere Mengen von Probenmaterial für das Screening nach thermophilen Mikroorganismen zuzusenden.

Tabelle 4-1 gibt eine Übersicht über ausländische Proben, die größtenteils aus Internet-Recherchen und e-Mail-Kontakten resultierten.

Tabelle 4-1: Übersicht über ausländisches Probenmaterial für Anreicherung und Screening thermophiler PD bildender Mikroorganismen

Herkunftsland	Probenanzahl
Indonesien	4
Island	12
Italien	2
Japan	3
Nepal	7
Neuseeland	6
Portugal (Azoren)	7
Slowakei	1
USA	7

4.1.2 Anreicherung, Screening und Isolierung von thermophilen PD Bildnern

Für die Anreicherung thermophiler PD-Bildner wurde ein Aliquot einer Boden- oder Flüssigprobe in ein luftdicht verschließbares Injektionsvial gegeben und anschließend in eine Anaerobierbank (FormaScientific, Marietta, OH, USA) mit sauerstofffreier Atmosphäre überführt (Abbildung 4-2).



Abbildung 4-2: System zum mikrobiologischen Arbeiten unter Sauerstoffausschluss (Anaerobierbank, AB).

Links befindet sich der anaerobe Arbeitsbereich, rechts die Schleuse und die Steuereinheit.

Hier wurde zu den Proben anaerobes Medium gegeben, dass auf die spätere Inkubationstemperatur vorgeheizt war, um die unerwünschte Kultivierung eventuell in den Proben vorhandener *mesophiler* Mikroorganismen während einer ansonsten auftretenden Aufwärmphase zu verhindern. Anschließend wurden die Injektionsvials mit Butylgummisepten gasdicht verschlossen, aus der Anaerobierbank ausgeschleust und bei Temperaturen zwischen 55 und 80 °C inkubiert.

Für die Anreicherung thermophiler anaerober Glycerinverwerter wurden verschiedene Medien eingesetzt (vgl. 4.2.3). Um möglichst viele verschiedene Thermophile aus den Proben anreichern zu können, wurde für die meisten Proben das reichhaltige gepufferte RCM mit Pharmaglycerin verwendet. Die enthaltene Glucose und komplexe Komponenten sollten das Anwachsen auch solcher Zellen in den Proben ermöglichen, die durch Transport und Lagerung „geschwächt“ sind. Die bei Verwertung der Glucose auftretende pH-Wert-Senkung durch Bildung organischer Säuren soll durch die Pufferung mit Phosphat abgemildert werden, sodass die gewachsenen thermophilen Organismen nach der Verwertung der Glucose noch bei physiologischem pH-Wert auf eine Verwertung von Glycerin wechseln können. Bei vielen Bodenproben wurde – oft zusätzlich – eine direkte Anreicherung auf Thermophilen-Medium (TM) versucht. Hier können praktisch nur solche Mikroorganismen wachsen, die anaerob mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle auskommen. Diese Form der selektiveren Anreicherung auf glycerinhaltigem Mineralsalzmedium wurde mit allen Bodenproben bei dem an der TU Hamburg-Harburg durchgeführten Screening gewählt (vgl. 4.1.1).

Das Wachstum thermophiler Mikroorganismen in den Anreicherungsansätzen wurde anhand einer zunehmenden Trübung der Ansätze festgestellt. Um anaerobe Glycerinverwertung und PD-Bildung festzustellen, wurden von den bewachsenen Ansätzen Proben mittels HPLC analysiert (vgl. 4.11.1). Da der Nachweis von PD mit HPLC notwendig jedoch nicht hinreichend ist, wurde bei positivem Ergebnis der HPLC Analytik zusätzlich eine GC-Analyse durchgeführt (vgl. 4.11.2), um den Befund zu verifizieren.

Aus denjenigen Anreicherungskulturen, die bei fortgesetzter Kultivierung in TM stabil PD-Bildung zeigten, wurde versucht, Reinkulturen zu gewinnen. Dazu wurde ein Aliquot einer aktiven Kultur anaerob auf TM-Nährböden ausplattiert und inkubiert. Zur weiteren Vereinzelung wurde

Zellmaterial von entstandenen Kolonien oder vom Zellrasen zum Erhalt von Einzelkolonien mit einer Impföse auf TM1-Nährböden ausgestrichen (NÄVEKE und TEPPER 1982) und erneut inkubiert. Dabei entstandene Einzelkolonien wurden mit einer Impföse in sterilen Injektionsvials in flüssiges TM überimpft. Nach Inkubation konnte durch HPLC-Analytik nachgewiesen werden, dass mit der Einzelkolonie der PD bildende Stamm in Reinkultur gewonnen worden war.

4.2 Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Spezialchemikalien

Im folgenden ist die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien wiedergegeben. Dabei kann an dieser Stelle nicht auf alle Varianten und Ergänzungen der einzelnen Medien eingegangen werden. Falls Medienbestandteile zusätzlich oder in abgewandelter Form zugesetzt wurden, wird darauf im Einzelfall hingewiesen.

Es wurden i.d.R. Chemikalien in *pro analysi* Qualität von Merck (Darmstadt) oder Fluka (Buchs, CH) eingesetzt. Als C-Quelle wurden vorwiegend das Roh- und Reinglycerin aus der Biodieselanlage der Oelmühle Connemann in Leer in Ostfriesland verwendet (vgl. 4.2.5). Als komplexer Medienbestandteil wurde granulierter Hefeextrakt von Merck (Darmstadt) benutzt. Für die Herstellung von Nährböden wurde Agar (Merck, Darmstadt) mit einer Konzentration von $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ eingesetzt.

4.2.1 Mineralsalzmedium zur Kultivierung von *C. butyricum* NRRL B-1024

Dieses Medium wurde in verschiedenen Variationen für die Stammhaltung, für die Anzucht von Biomasse, sowie für Aktivitätstests in Schüttelkolben und Fermentationen eingesetzt. Zur Untersuchung der 1,3-PD-Bildung von *C. butyricum* in Schüttelkolbentests wurde folgendes Medium eingesetzt:

KH ₂ PO ₄	1,36 g	(10 mM, Fermentation)
	9,09 g	(66 mM, Schüttelkolben)
NH ₄ Cl	0,535 g	(10 mM, suspendierte Zellen)
	5,35 g	(100 mM, immobilisierte Zellen)
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,123 g	
CaSO ₄ · 2 H ₂ O	0,017 g	
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,010 g	
Hefeextrakt	1,0 g	
Resazurin, 0,1 %	1 mL	
Spurenelementelösung, DSMZ 144	10 mL	
L-Cystein · HCl	0,25 g	
Glycerin ^{*)}	(variabel)	
pH 7,5	ad 1 L deion. H ₂ O	
(pH-Einstellung mit 2 M NaOH)		

^{*)} Die Tests der Biokatalysatoren erfolgten bei unterschiedlichem Glyceringehalt. Das Glycerin wurde in verschiedenen Qualitäten eingesetzt (vgl. 4.2.5).

Als Spurenelementelösung wurde die Lösung zu Medium 144 der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) verwendet.

Das L-Cystein · HCl dient als Reduktionsmittel. Es wurde nach Vorheizen des Mediums in einem Mikrowellengerät (Moulinex, Solingen) auf etwa 80 °C und unmittelbar vor dem Autoklavieren zugegeben. Das Medium wird nach dem Autoklavieren als sauerstofffrei betrachtet – das Resazurin ist entfärbt.

Für die Nennung des Mineralsalzmediums wird in dieser Arbeit häufig eine Kurzschreibweise verwendet. So bezeichnet etwa **MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵** ein mit **66** mM Phosphat gepuffertes Mineralsalzmedium (**MinS**) mit einem Stickstoffgehalt (**N**) von **10** mM und einem Glyceringehalt von **25** g · L⁻¹ bei verwendetem Rohglycerin (**RG**).

4.2.2 Medien zur Untersuchung der Sporenbildung bei *C. butyricum* NRRL B-1024

28 Mineralsalzmedium

Die Zusammensetzung ist in 4.2.1 beschrieben.

RCM, *Reinforced Clostridia Medium*, Fertigmedium (Oxoid, Wesel)

Hefeextrakt	3,0 g
Fleischextrakt	10,0 g
Pepton	10,0 g
Stärke, löslich	1,0 g
Glucose	5,0 g
Cystein · HCl	0,5 g
NaCl	5,0 g
Natriumacetat	3,0 g
Agar	0,5 g
pH 6,8 ± 0,2	ad 1 L deion. H ₂ O

Sporulationsmedium nach HÄGGSTRÖM und MOLIN 1980

Stärke, wasserlöslich	40,0 g
KH ₂ PO ₄	0,75 g
Na ₂ HPO ₄	0,40 g
NH ₄ Cl	0,8 g
Spurenelementelösung SP	1,0 mL
Hefeextrakt	1,0 g
Pepton	1,0 g
pH 6,5	ad 1 L deion. H ₂ O

Für die durchgeführten Fermentationen wurde anstelle der wasserlöslichen Maisstärke D-2256 (Sigma, Deisenhofen) ein Glucosesirup vom Typ C*Sweet 01127 von Cerestar (Cerestar Deutschland, Krefeld) mit einem Glucoseanteil von 16 bis 18 % verwendet.

Milch

Es wurde ultrahocherhitzte entrahmte H-Milch mit einem Fettanteil von 0,3 % verwendet.

4.2.3 Medien zur Anreicherung und Untersuchung thermophiler Mikroorganismen

Thermophilen-Medium (TM) zur Kultivierung in Injektionsvials

Pufferung:		
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O + KH ₂ PO ₄	2,5 g + 1,0 g	(TM1)
MES	10,0 g	(TM2)
NH ₄ Cl	1,0 g	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g	

Hefeextrakt	3,0 g
Glycerin ^{*)}	(variabel)
Spurenelementelösung, DSMZ 144	10 mL
Vitaminlösung, DSMZ 141	10 mL
Resazurin	1,0 mg
Cystein · HCl ^{**)}	0,5 g
pH 7,0 (Phosphat), pH 6,5 (MES)	ad 1 L deion. H ₂ O

Thermophilen-Medium (TM) zur Kultivierung im Fermenter

	TM2-1	TM2-2
MES	2,0 g	4,0 g
NH ₄ Cl	1,0 g	2,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g	0,2 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,87 g	1,74 g
Hefeextrakt	3,0 g	6,0 g
Glycerin ^{*)}	(variabel)	(variabel)
Spurenelementelösung, DSMZ 144	10 mL	20 mL
Vitaminlösung, DSMZ 141	10 mL	20 mL
Resazurin	1,0 mg	2,0 mg
Cystein · HCl ^{**)}	0,5 g	1,0 g
pH 6,0	ad 1 L deion. H ₂ O	

*) Glycerin wurde in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Für die Anreicherung wurde Glycerin in Pharmaqualität eingesetzt, um durch das im Rohglycerin enthaltene Sulfat nicht die Anreicherung von Sulfatreduzierern (H₂S-Bildnern) zu fördern.

**) Das Cystein · HCl wurde nach Erhitzen des Mediums und unmittelbar vor dem Autoklavieren zugegeben.

Die angeführten Tabellen geben die Standardzusammensetzung des Thermophilen-Mediums wieder. Es wurde eine Reihe von Variationen verwendet, die im Einzelfall angegeben sind. Für die Kultivierung des thermophilen Stammes AT1 wurde statt des angegebenen Phosphatpuffers (pK_s -Wert 7,2) als Puffersubstanz 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) verwendet. Mit einem pK_s -Wert von etwa 6,1 ist sie für den gewünschten Bereich der Pufferung bei etwa pH 6,0 ideal. Zudem ist eine Pufferung mit Phosphat für die Kultivierung von Alginatimmobilisaten schlecht geeignet (VORLOP 1984).

Kultivierung von Alginatperlen mit AT1

Im Medium zur Kultivierung von Alginatperlen mit AT1 wurde die Konzentration von CaCl₂ · 2 H₂O auf 1 g · L⁻¹ (TM2-1) bzw. 2 g · L⁻¹ (TM2-2) erhöht, um das Verhältnis aus der Summe der vorhandenen Kationen, z.B. Na⁺, Mg²⁺, NH₄⁺ und K⁺, zu Ca²⁺ möglichst nicht höher als 20:1 werden zu lassen (VORLOP 1984).

Gepuffertes Reinforced Clostridia Medium (RCM) mit Reinglycerin

RCM (vgl. 4.2.2)	19,0 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,25 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Reinglycerin	10,0 g
pH 7,0 mit 5 M NaOH	ad 1 L deion. H ₂ O

4.2.4 Verwendete Spurenelemente- und Vitaminlösungen

Spurenelementelösung SP

CaCl ₂ · 2 H ₂ O	7,3 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,09 g
FeCl ₃	6,0 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,85 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,08 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,09 g
ad 1 L deion. H ₂ O	

Spurenelementelösung zu DSMZ-Medium 144

Nitrilotriessigsäure	12,8 g
FeCl ₃ · 4 H ₂ O	0,2 g
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,17 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂	0,1 g
CuCl ₂	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,026 g
NaCl	1,0 g
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	0,02 g
ad 1 L deion. H ₂ O	

Vitaminlösung zu DSMZ-Medium 141

Biotin	2,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Pyridoxin-HCl	10,0 mg
Thiamin-HCl	5,0 mg
Riboflavin	5,0 mg
Nikotinsäure	5,0 mg
D,L-Ca-Pantothenat	5,0 mg
Vitamin B ₁₂	0,1 mg
p-Aminobenzoessäure	5,0 mg
Liponsäure	5,0 mg
ad 1 L deion. H ₂ O	

Die Lösungen wurden meist zweifach oder fünffach konzentriert angesetzt, um eine bessere Einwaagegenauigkeit zu erreichen und anschließend in entsprechend geringerer Menge beim Ansetzen der Medien verwendet.

4.2.5 Verwendete Glycerinsorten

Für Anzucht, Tests und Fermentation wurde vorwiegend das Rohglycerin aus der Biodieselproduktion der Oelmühle Connemann in Leer verwendet. Darüber hinaus wurde für Vergleichstests aufgereinigtes Glycerin in Pharmaqualität (99,5 %) aus der gleichen Produktionsanlage sowie Rohglycerin aus einer Biodieselanlage in Bruck, Österreich, eingesetzt.

Bei den erwähnten Rohglycerinen handelt es sich um teilaufkonzentrierte Chargen mit einem Gehalt von etwa 78 % bzw. 88 % Glycerin. Für eine großtechnische Produktion sind Rohglycerine, wie sie für die Experimente eingesetzt wurden wahrscheinlich zu teuer (vgl. 3.1). Es müssen hier noch günstigere glycerinhaltige Abfälle aus Fettverarbeitungsanlagen eingesetzt werden. Ein solches Rohglycerinwasser mit etwa 9 % Glycerin aus einer Fettspaltungsanlage der Prignitzer Chemie GmbH in Wittenberge wurde in einer Fermentation eingesetzt.

Um den Prozess auf der Rohstoffseite auf eine solide Basis zu stellen, müsste eine möglichst große Zahl solch niedrig konzentrierter Rohglycerinwässer aus verschiedenen Umesterungs- und Verseifungsprozessen auf ihre Eignung überprüft werden. In der nachstehenden Tabelle sind die Ergebnisse der analytischen Untersuchung der verwendeten Glycerine dargestellt. Die Analysen wurden am Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der FAL mit ICP-MS durchgeführt.

Tabelle 4-2: Konzentrationen verschiedener Elemente bei den eingesetzten Glycerinen. Alle Angaben in ppm (mg je kg), Werte in Klammern nach REIMANN C 1999.

Element	Reinglycerin aus Leer	Rohglycerine		Rohglycerin- Wasser
		aus Leer	aus Bruck	
Glycerin^{*)}	99,5	77,9	88,0	~9
Al	0,7	0,7	(71,2)	3,1
Ca	36	71	(253)	56
Cd	0,001	0,004	(n.n.)	0,001
Cr	0,02	0,13	(0,6)	0,03
Cu	0,2	1,7	(1,6)	0,4
Fe	0,6	3,1	(25,5)	5,4
N	(n.n.)	(0,4)	(0,4)	(k.A.)
Ni	0,02	2,8	(0,24)	0,1
Mg	9,5	12,7	(33,1)	14,2
Mn	0,06	0,13	(1,8)	0,25
Mo	0,003	0,2	(k.A.)	0,02
P	0,8	143	(6330)	15
Pb	0,007	0,01	(1,1)	0,01
Zn	0,2	0,4	(18,0)	0,4

^{*)} % (w/v), Analysen mit HPLC

Um einen Eindruck von den Glycerinen zu geben, ist in Abbildung 4-3 ein Foto mit unterschiedlichen Rohstoffen gezeigt.



Abbildung 4-3: Optischer Vergleich unterschiedlicher Glycerine.

- a Pharmaglycerin
- b Rohglycerin Leer (RME)
- c Rohglycerin Bruck (RME)
- d Rohglycerinwasser Wittenberge
- e Rohglycerin Kassel (AME)

4.2.6 Sonstige Lösungen

PBS, *phosphate buffered saline*

NaCl	8,0 g
KCl	0,20 g
Na ₂ PO ₄	1,07 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
<hr/>	
ad 1 L deion. H ₂ O	

4.2.7 Verwendete Spezialchemikalien

Für die Geleinschlussimmobilisierung in LentiKats[®] wurden als Spezialchemikalien LentiKat[®]-Liquid und LentiKat[®]-Stabilizer eingesetzt (geniaLab, Braunschweig). Für die Herstellung der Alginatperlen wurde Na-Alginat vom Typ Protanal LF20/60 (Pronova, Oslo, N) eingesetzt.

4.3 Bereitung der anaeroben Medien

Vor dem Beimpfen mit anaeroben Mikroorganismen muss das Kulturmedium von Sauerstoff befreit und in Kulturgefäße überführt werden. Dies wurde auf verschiedene Weise erreicht.

Anaerobes Medium, Herstellung in Anlehnung an die HUNGATE-Technik

Die HUNGATE-Technik wurde zu Beginn bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten kontinuierlichen Fermentationsexperimente zur Bereitung größerer Mediumsmengen angewendet. Das Medium wird durch das Erhitzen beim Autoklavieren weitestgehend sauerstofffrei gemacht, bei hohen Temperaturen von 80 bis 90 °C aus dem Autoklaven entnommen und anschließend unter N₂-Begasung und Rühren auf Eis abgekühlt. Vorschriften für die Arbeit mit anaeroben Mikroorganismen finden sich bei HUNGATE 1969 sowie LJUNGDAHL und WIEGEL 1986.

Anaerobes Medium durch Autoklavieren, Anaerobierbank

Das Medium wurde nach der jeweils gegebenen Zusammensetzung ohne Zugabe von Cystein · HCl in Flaschen vorbereitet und in einem Mikrowellengerät auf etwa 70 bis 80 °C vorgeheizt. Anschließend wird gegebenenfalls das L-Cystein zugegeben und die Flasche leicht geöffnet in den vorgeheizten Tischautoklaven (Wolf SANOclav, Geislingen) gestellt. Nach Erreichen einer Temperatur von 100 °C im Gasraum lässt man etwa für 3 Minuten Wasserdampf und Sauerstoff entweichen und verschließt dann das Auslassventil. Nach Hochheizen auf 121 °C, einer Haltezeit von etwa 30 Minuten sowie Abkühlen auf 100 °C und einem Überdruck von 0 bar wird der Deckel des Autoklaven rasch geöffnet und die Flasche mit Medium umgehend zugekehrt. Die verschlossene Flasche wird nach Abkühlen auf RT in die AB eingeschleust und dort bis zu ihrer Verwendung gelagert oder für Experimente außerhalb der AB in luftdicht verschließbare Glasvials gefüllt.

Sowohl bei der HUNGATE-Technik als auch beim Autoklavieren wird die Entfernung des Sauerstoffes durch Zugabe von Cystein als Reduktionsmittel unterstützt. Allen Medien, die auf dem beschriebenen Mineralsalz- bzw. Thermophilen-Medium beruhen, wurde Resazurin als Redoxindikator zugegeben. Der Farbstoff reagiert sehr empfindlich auf zutretenden Sauerstoff durch Farbumschlag von farblos (sauerstofffrei) nach pink-violett (sauerstoffhaltig).

4.4 Stammhaltung

Clostridium butyricum NRRL B-1024

Bewachsene Kulturen von *C. butyricum* NRRL B-1024 in Mineralsalzmedium wurden anaerob bei Raumtemperatur gelagert. Diese Kulturen wurden im Abstand einiger Wochen mit 5 bis 10 % (v/v) auf frisches Medium überimpft, bei 35 °C in MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵ über Nacht inkubiert und anschließend wieder bei Raumtemperatur anaerob gelagert.

Für Aktivitätstests, Immobilisierungsexperimente und Fermentationen wurden von der Stammhaltungskultur entsprechende Vorkulturen beimpft. In größeren zeitlichen Abständen wurden Glycerinkulturen für die Dauerkonservierung des Stammes angelegt.

Thermophile Mikroorganismen

Für die Stammhaltung bei thermophilen Rein- und Mischkulturen wurden bewachsene Kulturen im Kühlschrank bei +5 °C gelagert und im Abstand weniger Wochen auf frisches Thermophilen-Medium überimpft und inkubiert. Die bewachsenen Kulturen wurden anschließend wieder im Kühlschrank gelagert.

Für Aktivitätstests, Fermentationen und Immobilisierungsexperimente wurden entsprechende Vorkulturen von der Stammhaltungskultur beimpft.

4.5 Anzucht von *C. butyricum* für die Immobilisierung

Aus einer zwei bis vier Wochen alten Kultur wurde eine 1. Vorkultur mit 5 % (v/v) auf MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵ (vgl. 4.2.1) angeimpft. Nach 17 h war diese Kultur schon seit 3 bis 5 h in der stationären Phase. Aus dieser stationären Phase wurde wiederum mit 5 % (v/v) eine 2. Vorkultur beimpft. Aus dieser wurde dann wiederum nach 17 h die eigentliche Bakterienkultur für die Immobilisierung mit 2 % (v/v) auf MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵ beimpft (Abbildung 4-4).

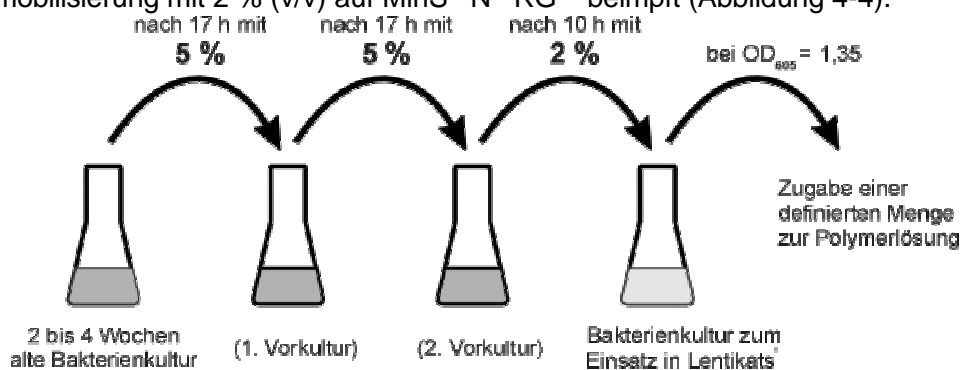


Abbildung 4-4: Überimpfschema zur definierten Anzucht von *C. butyricum* für die Immobilisierung

4.6 Immobilisierung von *C. butyricum* in linsenförmige Gele auf Basis von PVA – LentiKats®

4.6.1 Vorbereitung der Polymerlösung

Die gebrauchsfertige Polymerlösung LentiKat[®]Liquid wurde nach Vorschrift vorbereitet (genia-Lab 2001). Durch das notwendige Erhitzen wird gelöster Sauerstoff aus der Polymerlösung entfernt, da die Löslichkeit von O₂ mit steigender Temperatur sinkt (CHMIEL und WALITZA 1991) und in kochendem Wasser gar gegen Null geht.

Das Aufkochen erfolgt bei geschlossenem Schraubverschluss. Mehrfach wird der leichte Überdruck aufgrund des Wasserdampfes kurz durch Lösen der Schraubkappe ausgeglichen, wobei durch das Aufsprudeln der kochenden Flüssigkeit gleichzeitig O₂ ausgetrieben wird.

Nach vollständigem Lösen des PVAs wird die Polymerlösung auf etwa 30 bis 35 °C abgekühlt, die verschlossene Flasche in die Anaerobierbank eingeschleust und anschließend die entsprechende Menge an Clostridien-Vorkultur und eventuell sauerstofffreies Wasser zum Erreichen der gewünschten Biomasseanfangsbeladung zugegeben. Die Zellen werden durch kurzes Schütteln und nachfolgendes Rühren (3 Minuten) auf einem Magnetrührer gleichmäßig dispergiert. Anschließend wird die zellbeladene Lösung innerhalb der Anaerobierwerkbank (anaerob) oder außerhalb (aerob) zu LentiKats[®] weiterverarbeitet. Für die Herstellung von LentiKats[®] wurden verschiedene Methoden verwendet, die im folgenden erläutert werden sollen.

4.6.2 Herstellung von LentiKats[®]

Grundsätzlich wird zur Herstellung von LentiKats[®] das mit Zellsuspension vermischte LentiKat[®]Liquid auf eine glatte Oberfläche aufgetropft, wo durch kontrollierte Trocknung eine Gelierung der Tropfen stattfindet. Die getrockneten Tropfen werden anschließend in wässriger Stabilizerlösung zurückgequollen und gleichzeitig stabilisiert (SCHLIEKER 1999).

Das Auftropfen wurde auf verschiedene Weise mit sehr unterschiedlichem Aufwand und Maßstab durchgeführt. Die Herstellung der Immobilisate erfolgte stets ohne besondere Maßnahmen bezüglich der Sterilität. Das Erhitzen bei der Herstellung der PVA-Lösung sorgt zudem für eine Abtötung der ohnehin nur geringen Zahl von Keimen in den Ausgangsstoffen.

Herstellung mit Spritze und Kanüle

Bei dieser einfachen Art der Herstellung wird die zellbeladene Polymerlösung mittels einer Spritze mit Kanüle auf eine Kunststoffplatte getropft und dort bis zum Erreichen einer Restmasse von etwa 25 bis 30 % getrocknet. Die trockenen Partikel werden von der Oberfläche abgeschabt, in ein Gefäß überführt, mit Medium übergossen und in die AB eingeschleust.

Herstellung mit dem LentiKat[®] Printer

Um unter definierten Bedingungen *reproduzierbar* kleinere Mengen an LentiKats[®] im Bereich von 1 bis 50 g herstellen zu können, wurde mit dem LentiKat[®] Printer ein neuartiger Apparat entwickelt und gebaut (Abbildung 4-5).

Das Funktionsprinzip des LentiKat[®] Printers ist einfach: Ein Stahlstift wird kurzzeitig in eine Polymerlösung eingetaucht. Beim Herausnehmen bleibt Flüssigkeit haften, die sich als Tropfen am unteren Ende des Stiftes sammelt. Dieser Tropfen wird durch Aufsetzen des Stahlstiftes auf eine glatte Oberfläche überführt und geliert zu einem linsenförmigen Hydrogel.

Für die Herstellung werden große Einmalpetrischalen (Ø 145 mm) aus Polystyrol verwendet (Greiner, Nürtingen). In den Boden der Petrischale wird die zellbeladene PVA-Lösung gefüllt. In das Polymer werden die Stahlstifte mit dem Printer abgesenkt, angehoben und die anhaftenden Tropfen in den Deckel der Petrischale abgesetzt (Stempeln). Die mit Tropfen besetzten Platten werden zum Trocknen unter einen Ventilator gestellt. Werden für einen Ansatz mehrere Deckel bestempelt, kann durch vorübergehendes Abdecken mit einem Schalenboden der Trocknungsbeginn verzögert werden, bis alle Deckel bestempelt sind. Anschließend werden alle Platten gleichmäßig getrocknet bis eine bestimmte Menge der aufgetropften Polymerlösung verdunstet ist. Meist wurde bis zum Erreichen einer Restmasse von 25 oder 30 % getrocknet.



Abbildung 4-5: Apparat zur reproduzierbaren Herstellung von kleineren Mengen an LentiKats®:

links: Gesamtansicht,

rechts: Auftropfeinheit mit etwa 400 massiven Stahlstiften

Der Trocknungsvorgang wird durch Wiegen kontrolliert und bei Erreichen der Zielmasse durch Übergießen der Linsen mit anaerobem $\text{MinS}^{66}\text{N}^{10}\text{RG}^{25}$ abgestoppt. Nach einer Dauer von etwa 3 Minuten wird der Überstand abgegossen, und die fertigen LentiKats® lassen sich mühelos mit einem Gummiwischer auf der Platte zusammenschieben und in eine Flasche mit Stabilisierungslösung oder Kulturmedium überführen. Diese Flasche wird offen in die AB eingeschleust.

4.6.3 Nachbereitung der LentiKats®

Das Übergießen der Partikel nach der kontrollierten Trocknung mit Flüssigkeit erfüllt verschiedene Aufgaben:

- Definierte Beendigung des Trocknungsvorganges
- Rückquellen und Aufbau der Hydrogelstruktur
- Stabilisierung der Polymerstruktur
- Waschen der Hydrogelpartikel

Insbesondere wegen des letztgenannten Punktes und wegen des noch gelösten O_2 wird nach dem Einschleusen der LentiKats® in die Anaerobierbank der sauerstoffhaltige ÜS gegen anaerobes Kultivierungsmedium ausgetauscht. Nach etwa 2 h erfolgt zum Entfernen der ausgewaschenen Additive ein erneuter Austausch.

4.7 Immobilisierung des thermophilen Stammes AT1 in Alginatperlen

Die Immobilisierung von AT1 wurde zur Gewährleistung anaerober Bedingungen in der AB durchgeführt. Die für die Perlenbildung und das nachfolgende Waschen benötigten Flüssigkeiten wurden teilweise wie bei der Medienbereitung beschrieben (vgl. 4.3) durch Autoklavieren weitgehend von O_2 befreit und in die AB eingeschleust.

Für die Herstellung der Alginatperlen wurde folgende Lösung verwendet:

- 2 % (w/w) Alginat (Protanal LF20/60, Pronova, Oslo, Norwegen)
- 78 % (w/w) deionisiertes Wasser
- 20 % (w/w) für Zugabe der Biomasse

Zunächst wurde eine Alginatlösung mit Zellen hergestellt. Dazu wird unter kräftigem Rühren allmählich das Alginatpulver in Wasser eingestreut, um so Agglomeratbildung zu verhindern. Nach vollständigem Lösen wird die Alginatlösung zum Verringern der O_2 -Konzentration aufge-

kocht, auf etwa 60 °C abgekühlt und in die AB eingeschleust. Anschließend werden der Alginatlösung 20 % der Gesamtmenge in Form einer Vorkultur von AT1 zugegeben und dispergiert. Diese zellbeladene Alginatlösung wird entweder mit einer Spritze mit Kanüle oder bei größeren Mengen mit einer Abtropfapparatur (Eigenbau, FAL) mittels Druckluft in gerührte wässrige Lösung von 20 g · L⁻¹ CaCl₂ eingetropft. Die sich direkt nach dem Eintropfen durch ionotrope Gelbildung formenden Perlen werden nach wenigen Minuten aus dem Bad durch Absieben abgetrennt, kurz in sauerstofffreiem Leitungswasser zur Verringerung der Ca²⁺-Konzentration gewaschen und anschließend bei 60 °C in Thermophilen-Medium anaerob inkubiert.

4.8 Versuche im Kulturkolben oder Injektionsvials – Aktivitätstests

Verschiedene Versuchsreihen zur Überprüfung von Mediumskomponenten, zum Sporulationsverhalten und Aktivitätstests mit freien und immobilisierten Zellen sowie verschiedene Vorversuche zu Fermentationen wurden in kleinen *batch*-Ansätzen durchgeführt.

4.8.1 Thermophile Mikroorganismen

Für die thermophilen Mikroorganismen wurden dazu Injektionsvials aus Glas mit Butylgummi-septum und einem Volumen zwischen 5 und 100 mL verwendet. Die Ansätze wurden zumeist im Wasserbad (GFL, Burgwedel) inkubiert. Das Beimpfen und die Probenahmen erfolgten mit Spritze und Kanüle über das Septum.

4.8.2 *Clostridium butyricum* NRRL B-1024

Batch-Ansätze mit *C. butyricum* NRRL B-1024 wurden fast ausschließlich in 100-mL-Erlenmeyerkolben mit Überfallkappe durchgeführt. Die Kultivierung von freien Zellen und LentiKats[®] erfolgte im temperierbaren Inkubator *innerhalb* der AB, also offen unter anaerober Atmosphäre.

4.9 Versuche im Fermenter

Mit *C. butyricum* NRRL B-1024 und dem thermophilen Stamm AT1 wurden verschiedene Fermentationen in einem Maßstab zwischen 100 mL und 2 L bei unterschiedlicher Betriebsweise, also *batch*, *fed-batch* oder kontinuierlich, durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte fast ausschließlich in temperierbaren Doppelmantelglasgefäßen mit Magnetkernrührung.

Zur Schaffung und Aufrechterhaltung sauerstofffreier Bedingungen im Fermenter wurde mit technischem N₂ begast. Für alle Ab- und Zuleitungen wurden Schläuche aus Neopren (Norprene[®], Norton-Verneret, Charny, F) verwendet, da dieses Material zwar gut autoklavierbar jedoch im Gegensatz zu Silikonkautschuk eine nur geringe Durchlässigkeit gegenüber O₂ aufweist (BATZER 1985).

Da bei der heterofermentativen Umsetzung von Glycerin zu 1,3-Propandiol stets organische Säuren gebildet werden, wurde bei den Fermentationen der pH-Wert durch Zugabe von konzentrierter Natronlauge geregelt. Es wurden NaOH-Konzentrationen von 2, 4 und 8 M verwendet. Das verwendete Kulturmedium war mit 10 mM Phosphat geringer gepuffert als das entsprechende Medium für unregelte *batch*-Ansätze (66 mM Phosphat).

Die Protokollierung der wichtigsten Kultivierungsparameter, wie etwa Temperatur, pH-Wert, zudosierte Laugemenge und Redoxpotenzial erfolgte als rechnergestützte Datenerfassung mit der DASYlab[®] Software (datalog, Mönchengladbach). Daneben konnten weitere wichtige Fermentationsdaten *online* erfasst werden, beispielsweise die Begasungsrate sowie verschiedene Waagensignale zur Bestimmung und Kontrolle der Volumenströme bei kontinuierlicher Betriebsweise sowie von zudosierten Supplementen.

4.9.1 Batch-Fermentation des thermophilen Stammes AT1

Es wurden sowohl Fermentationen von freien als auch von in Alginat immobilisierten Zellen durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug etwa 300 mL. Um den Flüssigkeitsverlust durch die Begasung bei den hohen Temperaturen von etwa 60 °C gering zu halten, wurde der Abgasstrom durch einen etwa 40 cm langen Rücklaufkühler aus Glas geleitet, der auf 5 bis 10 °C gekühlt war.

4.9.2 Batch- und fed-batch-Fermentationen von *C. butyricum* NRRL B-1024

Sporulation

Es wurden mehrere einfache Fermentationen zur Untersuchung des verwendeten Kulturmediums auf die Sporulationsrate von *C. butyricum* NRRL B-1024 durchgeführt.

Der gesamte Fermenter wurde unter einer temperierbaren Inkubationshaube (INFORS, Einsbach) aufgestellt. Das Reaktionsvolumen betrug nur etwa 100 mL. Der pH-Wert konnte durch Zugabe von Natronlauge kontrolliert werden. Durch Begasung mit N₂ wurden anaerobe Bedingungen hergestellt. Der Fermenter und das Kulturmedium wurden durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert.

Suspendierte Zellen - Aktivitätstests

Mit freien Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024 wurde eine Fermentation im 2-L-Fermenter (meredos, Bovenden) durchgeführt. Der Fermenter und das Kulturmedium wurden durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert.

Immobilisierte Zellen – Wachstum und Aktivitätstests

LentiKats[®] mit *C. butyricum* NRRL B-1024 wurden in einer Reihe von *batch*- und *fed-batch*-Fermentationen kultiviert. Das verwendete Reaktionsgefäß hatte ein Arbeitsvolumen von maximal 1000 mL. Durch Regulierung des Füllstandes konnte der Immobilisatanteil α_B variiert werden.

Im Aufbau gleicht der benutzte Fermentationsstand dem des ausführlicher für den kontinuierlichen Betrieb beschriebenen Fermenters (vgl. 4.9.3). Um schnell anaerobes Medium für rasch aufeinanderfolgende Ansätze reproduzierbar vorzubereiten, wurde das Mischgefäß genutzt. Hier wurden die verschiedenen Komponenten Mineralsalzlösung, Glycerin und Hefeextrakt gemischt und durch N₂-Begasung von O₂ befreit.

Die Fermentationen von LentiKats[®] mit *C. butyricum* wurden unsteril, d.h. ohne vorheriges Autoklavieren von Reaktionsgefäß und Schläuchen oder Kulturmedien durchgeführt.

4.9.3 Kontinuierliche Fermentation von *C. butyricum* NRRL B-1024

In einer Reihe von kontinuierlichen Fermentationen wurden LentiKats[®] von *C. butyricum* NRRL B-1024 untersucht. Das verwendete Reaktionsgefäß hatte ein Arbeitsvolumen von maximal 500 mL. Durch Regulierung des Füllstandes konnte der Immobilisatanteil α_B variiert werden. Der Aufbau der Fermentationsstandes ist schematisch in Abbildung 4-6 gezeigt.

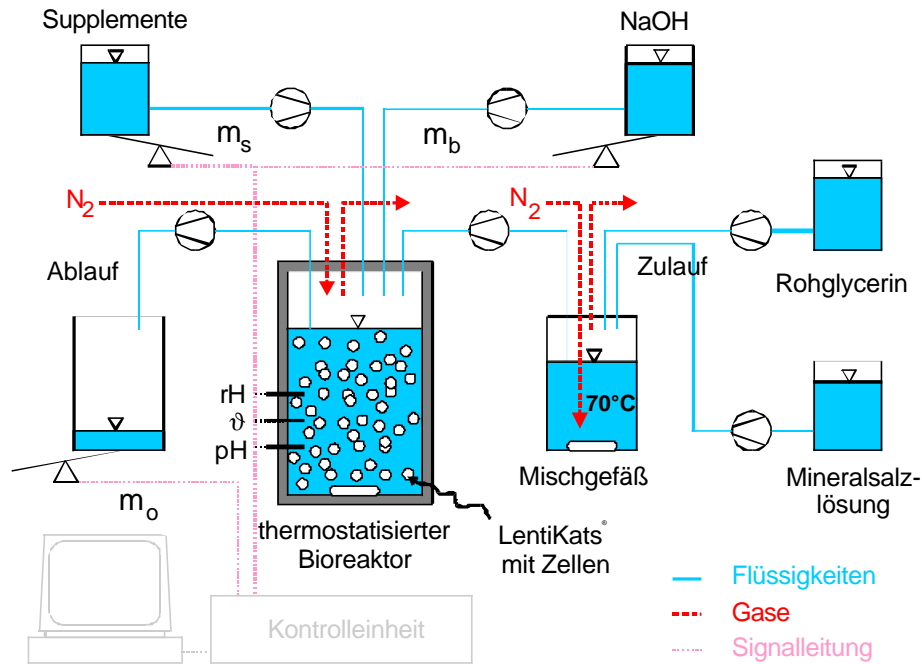


Abbildung 4-6: Schematische Darstellung des Aufbaus des kontinuierlich betriebenen Fermentationsstandes

Zu Beginn der Experimente bei kontinuierlichem Betrieb wurde das komplette Kulturmedium in 10-L-Chargen durch Autoklavieren und nachfolgendes Abkühlen unter N_2 -Begasung sauerstofffrei gemacht. Später wurde die gezeigte Kombination aus einzelnen Vorratsgefäßen für Mineralsalzlösung, Rohglycerin, Hefeextrakt (Supplement) sowie eventuell weitere Supplemente und einem beheizten Mischgefäß mit N_2 -Begasung gewählt, um das Kulturmedium in der gewünschten Menge, Zeit und Zusammensetzung unmittelbar vor der Nutzung vorzubereiten. Zusätzlich zum Mischgefäß konnte auch das Reaktionsgefäß selbst separat oder in Reihe mit N_2 begast werden.

Der je Zeiteinheit durch den Fermenter fließende Volumenstrom an Medium ist durch die dem Reaktionsgefäß selbst, vor allem jedoch durch die dem Mischgefäß zufließenden Ströme bestimmt. Die Pumpe, die über einen Absauger vom Mischgefäß zum Reaktionsgefäß pumpt, könnte mehr fördern, als dem Mischgefäß zufließt. Durch die Eintauchtiefe des Absaugers ist der Füllstand und nicht zuletzt auch die Verweilzeit im Mischgefäß wählbar. Das Abpumpen aus dem Reaktionsgefäß erfolgt ebenfalls über einen höhenverstellbaren Absauger, mit dem sich das Reaktionsvolumen V_R und damit bei gegebenem Volumenstrom die Verweilzeit wählen lassen. Die Ablaufpumpe ist jeweils so eingestellt, dass sie mehr als die zufließende Flüssigkeit abpumpen kann. Der Gesamtvolumenstrom durch das Reaktionsgefäß wird durch Wägung des Ablaufgefäßes kontrolliert.

Auch die kontinuierlichen Fermentationen von LentiKats[®] mit *C. butyricum* wurden unsteril, d.h. ohne vorheriges Autoklavieren von Reaktionsgefäß und Schläuchen oder Kulturmedien durchgeführt. Die Vorratsbehälter für Mineralsalzlösung und Rohglycerin können aus Mangel an C-Quelle bzw. aufgrund zu hoher Osmolarität praktisch nicht bewachsen. Lediglich der Vorrat an konzentrierter Hefeextraktlösung ($40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

4.10 Entnahme von Proben und Probenaufbereitung

Für die Bestimmung der Biomasse sowie verschiedener gelöster Inhaltsstoffe wurden Flüssigproben genommen. Aus Ansätzen in der Anaerobierbank wurden Proben von etwa 1 mL mit einer Pipette entnommen. Bei Ansätzen in Injektionsvials (Thermophile) sowie bei den Fermentationen wurden Proben von ebenfalls 1 mL mit einer Spritze und Kanüle gezogen.

Möglichst unmittelbar nach der Probenahme wurde die OD im Photometer bestimmt (PM2 A, Zeiss, Oberkochen) und danach die Probe für 5 Minuten bei 14.000 min^{-1} im 1,5-mL-Reaktionsgefäß zentrifugiert (Modell 5417, Eppendorf Gerätebau, Engelsdorf). Anschließend wird der zellfreie Überstand für die Analyse mit HPLC eingesetzt oder die zentrifugierte Probe bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei etwa 5°C gelagert.

Proben von neu hergestellten oder schon inkubierten Immobilisaten wurden direkt mit einem kleinen Löffel oder Spatel aus dem Kulturkolben oder Fermenter entnommen und bis zu ihrer weiteren Verwendung in 1,5-mL-Reaktionsgefäßen im Kühlschrank bei etwa 5°C gelagert.

4.11 Analytik

4.11.1 Bestimmung von Metaboliten mit Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Glycerin sowie die Produkte der mikrobiellen Umsetzung, also organische Säuren und Alkohole wurden mit einer HPLC-Analytik bestimmt. Die wichtigsten Komponenten und Messeinstellungen der benutzten Anlage sind in der folgenden Aufstellung aufgeführt:

Gerätekomponenten:	: Entgaser, Pumpe, Autosampler, Ofen, Detektor (Shimadzu, Duisburg)
Laufmittel, Flussrate:	: entgaste $5 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$, $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
Probenvolumen:	: $30 \mu\text{L}$
Vorsäule:	: Cation H Cartridge Microguard® (BIO-RAD, München)
Trennsäule:	: Aminex® HPX 87H (BIO-RAD, München)
Säulentemperatur:	: 60°C
Detektionsprinzip:	: Brechungsindex (RI) Detektor
Analysendauer:	: 20 oder 25 Minuten
Mess- und Auswerte-Software:	: CLASS LC10 (Shimadzu, Duisburg)

Den schematischen Aufbau der verwendeten HPLC-Anlage zeigt Abbildung 4-7.

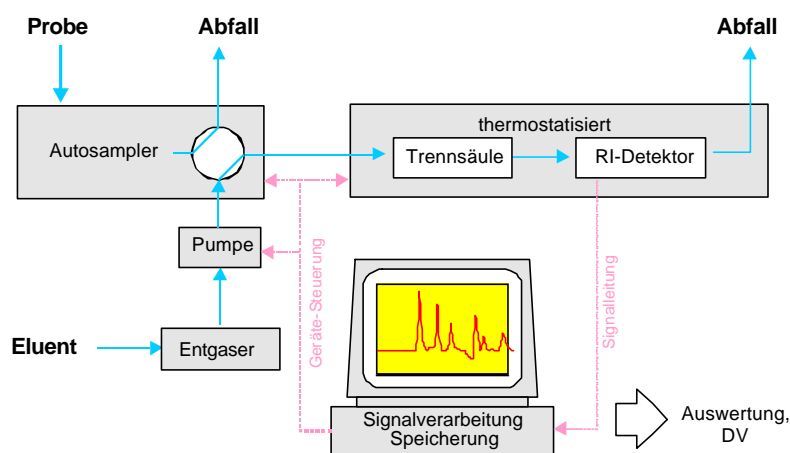


Abbildung 4-7: Prinzipskizze der durchgeführten HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Metaboliten des Glycerinstoffwechsels.

In Abbildung 4-8 ist ein typisches Chromatogramm der Analyse einer anaeroben Umsetzung von Glycerin mit *C. butyricum* gezeigt.

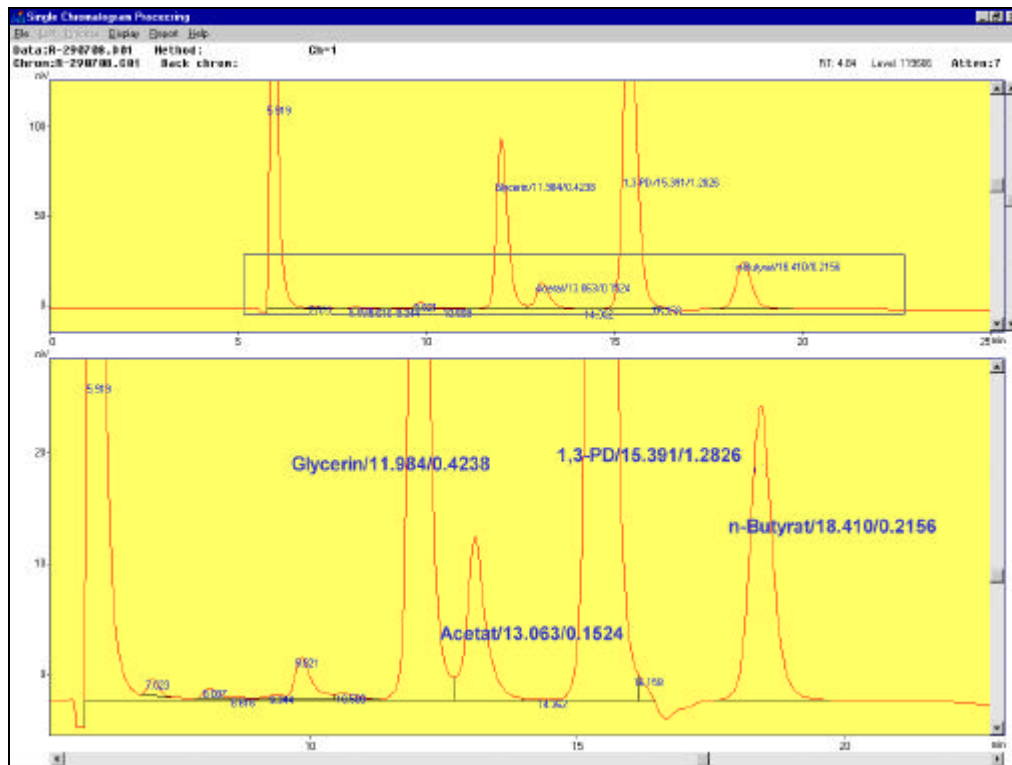


Abbildung 4-8: Typisches Chromatogramm einer Probe aus einer anaeroben Umsetzung von Glycerin mit *C. butyricum*, Analysedauer: 20 Minuten.

4.11.2 Bestimmung von Metaboliten mit Gaschromatographie (GC)

Zur qualitativen Bestimmung von 1,3-Propandiol wurde zusätzlich zur Bestimmung mit Flüssigkeitschromatographie (HPLC) die bei Reimann beschriebene Analytik durch Gaschromatographie (GC) eingesetzt (REIMANN C 1999). Die Analytik mit GC wurde immer dann zusätzlich herangezogen, wenn in den Anreicherungskulturen mit der HPLC-Analytik ein Signal mit etwa der Retentionszeit von PD nachgewiesen wurden. Durch diese doppelte Bestätigung sollte die Bildung von PD zweifelsfrei bestätigt werden.

4.11.3 Bestimmung von H_2 und CO_2 in Abluftproben mit Gaschromatographie (GC)

Zur Überprüfung der Gasbildung wurden im Abgasstrom einer kontinuierlichen Fermentation von *C. butyricum* die Wasserstoff- und Kohlendioxidkonzentration bestimmt.

Zur Entnahme der Proben wurde ein evakuiertes 22-mL-Glasvial für mehrere Stunden in den Abgasstrom integriert und der Inhalt anschließend im *headspace*-GC vermessen. Die Analyse von CO_2 ist bei HÜTHER beschrieben (HÜTHER *et al.* 1998). Für die Messung von H_2 wurde anstelle von Helium als Trägergas Stickstoff verwendet.

4.11.4 Biomassebestimmung

Die Biomasse wurde routinemäßig mittels photometrischer Messung (PM2 A, Zeiss, Oberkochen) der optischen Dichte (OD) bestimmt, die nach entsprechender Kalibrierung auf die Zelldichte und die Biotrockenmasse umgerechnet werden konnte. Die Messung der OD erfolgte stets gegen Wasser als Referenzwert.

Für die Kalibrierung wurde eine Kultur von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 mit 0,05 % (v/v) auf MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵ beimpft und gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase durch plötzliches Abkühlen im Eisbad gestoppt. Beispielhaft ist in Abbildung 4-9 der Zeitpunkt des Abstoppens der Bakterienkultur zur Kalibrierung der Biomassebestimmung innerhalb des typischen Kulturverlaufs gezeigt.

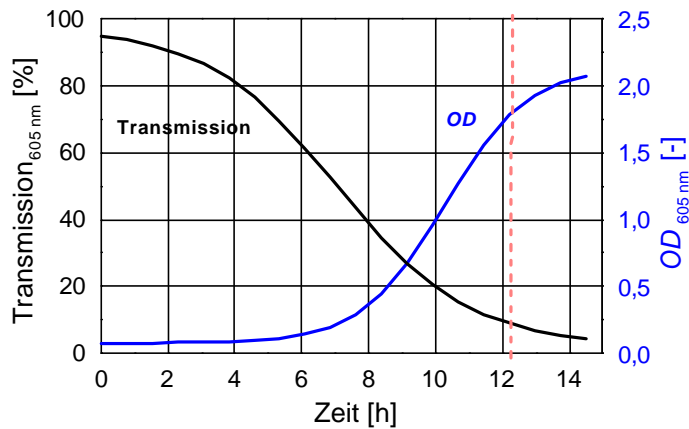


Abbildung 4-9: Der Zeitpunkt des Abstoppens der Bakterienkultur zur Biomassebestimmung wird durch die gestrichelte Linie markiert.

In der entnommenen Kultur wurden mit einer Zählkammer nach HELBER etwa $5,8 \times 10^8$ Zellen je mL gezählt (vgl. 4.11.5). Nachfolgend wurden Verdünnungsreihen dieser Bakterienkultur hergestellt, und der Zusammenhang zwischen der OD und der errechneten Zelldichte ermittelt. Daneben wurde zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) der entnommenen Bakterienkultur zweimal 10 mL mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe durch einen 0,45 µm-Polyamid-Filter (Sartorius, Göttingen) filtriert, dreimal mit 10 mL Wasser gewaschen, das Pellet auf dem Filter bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend die BTM auf einer Analysenwaage gravimetrisch bestimmt (Doppelbestimmung).

Der sich ergebende Zusammenhang zwischen Zellzahl, OD und BTM ist in Abbildung 4-10 gezeigt.

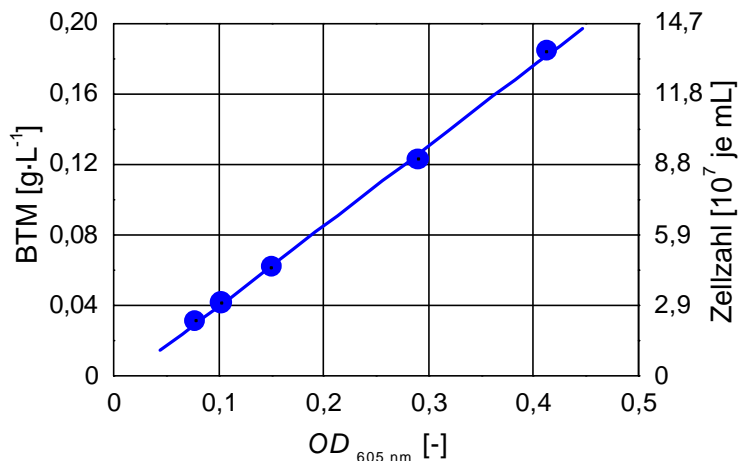


Abbildung 4-10: Zusammenhang zwischen Zellzahl, OD und BTM für *C. butyricum* NRRL B-1024.

Der gezeigten Regressionsgerade liegt der folgende Zusammenhang zwischen OD und BTM zugrunde,

$$\text{BTM} = 0,4548 \cdot \text{OD}_{605 \text{ nm}} = -0,4548 \cdot \log_{10}(T_{605 \text{ nm}}).$$

Anhand dieser Gleichung wurde aus den gemessenen Werten für die Transmission die entsprechende BTM berechnet. Bei Transmissionen unterhalb etwa 0,40 wurden die Proben bis wenigstens zum Erreichen eines oberhalb dieser Grenze liegenden Wertes verdünnt.

Die spezifische Wachstumsrate von *C. butyricum* NRRL B-1024 wurde mit etwa $0,23 \text{ h}^{-1}$ im Schüttelkolben bestimmt (Abbildung 4-11).

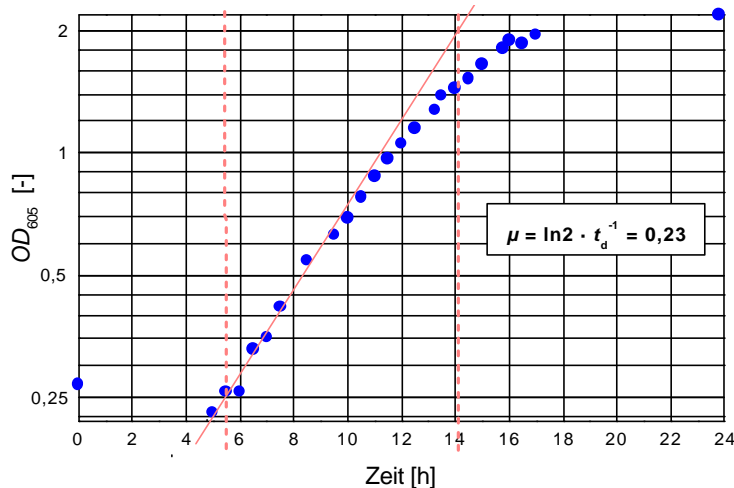


Abbildung 4-11: Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate von *C. butyricum* NRRL B-1024 im Schüttelkolbenexperiment.

Medium: MinS⁶⁶N¹⁰RG⁵⁰, pH 7,5,
 $J = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_R = 300 \text{ mL}$

4.11.5 Mikroskopische Untersuchungen

Flüssigproben

Proben aus Bakterienkulturen wurden regelmäßig mikroskopisch untersucht, um die Reinheit dieser Kulturen, d.h. das Fehlen von kontaminierenden MO, zu überprüfen.

Daneben wurden unter dem Lichtmikroskop die Zellzählungen mit Zählkammer durchgeführt, sowie der Sporulationsgrad bei verschiedenen Experimenten mit *C. butyricum* bei 400-facher Vergrößerung abgeschätzt.

Immobilisate

Die mikroskopische Untersuchung spielte eine zentrale Rolle bei der Bewertung der Immobilisate, z.B. bei der Abschätzung der Überlebensrate während der Immobilisierung, der Bestimmung des Koloniedurchmessers, der Kontrolle der Kolonieverteilung oder der Beobachtung des Anwachsens der immobilisierten Zellen.

Die Untersuchungen wurden meistens mit einer Stereolupe (SV8, Zeiss, Oberkochen) durchgeführt, insbesondere für die *Beobachtung ganzer oder mehrerer Gelpartikel*. Für die Betrachtung von Zellen innerhalb der Kolonien im Gel wurden meist Quetschpräparate mit einem Lichtmikroskop (Axioplan mit Fotoeinheit MC100, Zeiss, Oberkochen) untersucht. Zur Erhöhung des Kontrastes zwischen immobilisierter Biomasse und umgebender Gel-Matrix wurden die Zellen für 30 Minuten in 1:100 verdünnter Carbol-Fuchsin-Lösung (Färbelösung nach ZIEHL und NEELSEN, Fluka, Buchs, CH) angefärbt und danach insgesamt 30 Minuten mehrmals mit Leitungswasser entfärbt. Der Farbstoff lässt sich dabei aus der zellfreien Gelmatrix auswaschen.

Zur Visualisierung der Koloniebesiedlung im Inneren von LentiKats[®] wurden Mikrotom-Dünnschnitte von zellbeladenen LentiKats[®] am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig von Herrn Dr. OLIVER PABST durchgeführt. In einer steigenden Reihe von 30, 50, 70, 80, 90, 95 und zweimal 100 % Ethanol_{aq.} für je 20 Minuten wer-

den die Hydrogele zunächst dehydratisiert, anschließend zweimal für je 30 Minuten in Xylol überführt, 1 h in einem Gemisch von einem Teil Xylol und einem Teil Paraplast (Sigma, Deisenhofen) und zweimal für 4 h in reinem Paraplast inkubiert. Die Inkubation erfolgt hierbei bei 60 °C. Die LentiKats[®] werden anschließend nach Erstarren auf Eis auf einem Mikrotom (Leica Jung Autocut 2055, Wetzlar) in Scheiben von 6 µm Dicke geschnitten. Die Schnitte werden auf einem Objektträger gesammelt und dort durch Behandlung mit zweimal 5 Minuten in Xylol, zweimal 5 Minuten in Ethanol deparaffiniert. Durch je einminütige Behandlung in der Ethanolreihe in der umgekehrten oben durchgeführten Reihenfolge werden die LentiKat[®]-Schnitte in wässrige Phase überführt und anschließend für besseren Kontrast gefärbt. Um die Schnitte durch Eindeckelung dauerhaft zu präparieren, wird wiederum in Schritten von je 1 Minute in steigender Reihe Wasser durch Ethanol ersetzt und anschließend je zweimal für 5 Minuten in Ethanol und Xylol inkubiert. Abschließend erfolgt die Eindeckelung mit xylolhaltigem Entellan (Merck, Darmstadt).

5 Ergebnisse und Diskussion – Immobilisierung in LentiKats®

5.1 Herstellung

44 5.1.1 Herstellung mit Spritze und Kanüle

Diese Art der Herstellung wurde nur für kurze Zeit in den ersten Experimenten praktiziert. Die Vor- und Nachteile sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Spritze und Kanüle	
Maßstab	0 bis 5 g
Vorteile	■ sehr kleine Mengen möglich, d.h. geringer Materialaufwand bei wertvollem Probenmaterial
Nachteile	■ hoher Zeitaufwand ■ schlechte Kontrolle der Trocknung ■ ungleichmäßige Form und Größe

Die Herstellung mit Spritze ist sehr zeitraubend. Problematisch dabei ist vor allem, dass schon bei geringen Mengen eine größere Zeitspanne zwischen Beginn und Ende des Auftropfens vergeht, die gegenüber der eigentlichen Trockenzeit nicht vernachlässigbar ist. Die Trocknung der früh und spät hergestellten Gel-Linsen ist demnach unterschiedlich. Zudem ist es schwierig, den Beginn der Trocknung zeitlich festzulegen und einen definierten Bezugspunkt für die Kontrolle der Masse während der Trocknung zu haben. Die Herstellung von LentiKats® mit Spritze erlaubt weiterhin bei vertretbarem Aufwand keine einheitliche Größe und Form der Immobilisate. Auch dies führt zu einer mangelhaften Kontrolle der Trocknung, da bei Ende des Gelierungsvorganges große Tropfen noch zu wenig, kleine hingegen fast vollständig getrocknet sind. Letztendlich führten die Schwierigkeiten und Unzulänglichkeiten dieser Art der Herstellung, insbesondere bei der Arbeit mit empfindlichen Zellen, zur Entwicklung des LentiKat® Printers.

5.1.2 Herstellung mit dem LentiKat® Printer

Vor- und Nachteile des LentiKat® Printer sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

LentiKat® Printer	
Maßstab	1 bis 100 g
Vorteile	■ gute Kontrolle des Trocknungsgrades ■ gleichmäßige Größe und Form der Immobilisate
Nachteile	■ erforderliche Mindestmengen und Verluste an Polymerlösung

Mit dem LentiKat® Printer können auf einer Platte mehr als 400 identische Tropfen in einem Arbeitsgang parallel hergestellt werden. Dies entspricht je nach Größe der einzelnen Gel-Linse meist etwa 1,5 bis 3 g. Durch Wiederholung werden ohne zu großen Aufwand bis zu etwa 100 g LentiKats® produziert. Unmittelbar nach dem Stempelvorgang kann die Masse der Tropfen einer Platte und somit der Startwert der Trocknung bestimmt werden. Bei Erreichen der errechneten Zielmasse wird der Trocknungsvorgang abrupt gestoppt, indem die Gel-Linsen direkt auf

den Platten mit Flüssigkeit übergossen werden. Diese Art der Herstellung erlaubt die exakte Kontrolle des Trocknungsgrades.

Bei Verwendung von Einmalpetrischalen aus Polystyrol konnten die LentiKats® etwa 2 bis 3 Minuten nach dem Übergießen problemlos mit einem Gummiwischer von der Oberfläche abgelöst werden.

5.2 Dünnschnitte von zellbeladenen LentiKats®

Zur Visualisierung der Koloniebesiedlung wurden am Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU Braunschweig von Herrn Dr. PABST Mikrotom-Dünnschnitte von zellbeladenen LentiKats® angefertigt.

Die LentiKats® zur Untersuchung von Dünnschnitten wurden anaerob in der AB hergestellt. Die Biomasseanfangsbeladung betrug $6,2 \times 10^7$ Zellen je mL. Etwa 5,8 g feuchte zellbeladene LentiKats® wurden anschließend in 250 mL MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵ anaerob bei 30 °C inkubiert. Nach 33 und 47 h wurde der ÜS gegen frisches Medium ausgetauscht. Die LentiKats® wurden nach 67 h aus dem anaeroben Ansatz entnommen. Abbildung 5-1 und Abbildung 5-2 zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten.

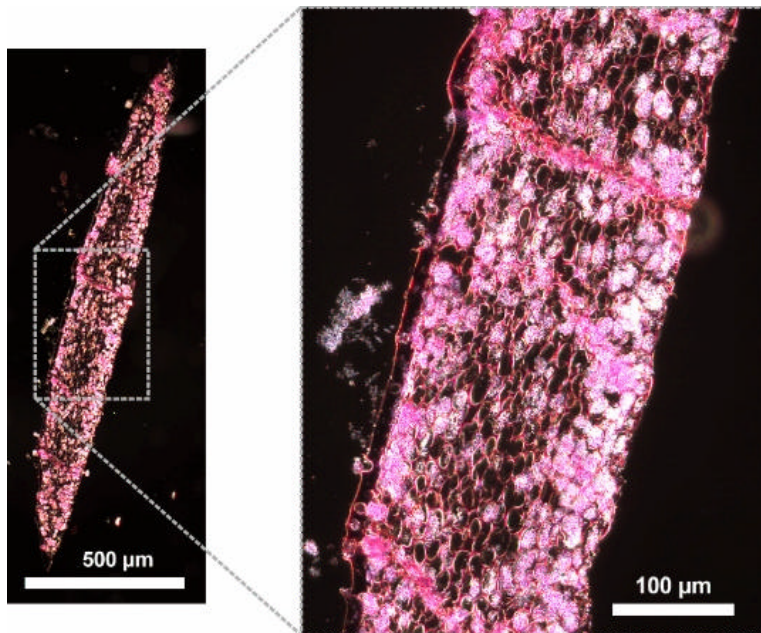


Abbildung 5-1: Lichtmikroskopische Aufnahme von Dünnschnitten von LentiKats® mit *C. butyricum* NRRL B-1024. Dicke der Schnitte: 6 µm. Die Aufnahmen sind bei 25-facher und 100-facher Vergrößerung mit Phasenkontrast entstanden. Die Fotos zeigen deutlich die Konzentrierung der Kolonien im Randbereich der Gel-Linsen sowie den dünner besiedelten Zentralbereich.

Bei den Querstreifen handelt es sich um Artefakte aus der Präparation.

In Abbildung 5-1 erkennt man deutlich die stärkere Besiedelung der äußeren Schicht des LentiKats®. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass sich während der aufwändigen Präparation Kolonien und Zellen aus der Porenstruktur gelöst haben, jedoch sollte sich dieser Biomasseverlust gleichmäßig auf das gesamte Präparat erstrecken und kann so nicht für den zellärmeren zentralen Bereich verantwortlich sein.

Offenbar ist die Biomasseanfangsbeladung so hoch gewählt, dass trotz der nur geringen Dicke von etwa 200 µm aufgrund der dichten äußeren Biomassenschicht der zentrale Bereich nur unzureichend an der Umsetzung teilnimmt. Bei den Querstreifen handelt es sich um Artefakte aus der Präparation.

Abbildung 5-2 zeigt auch die poröse Struktur des PVA-Hydrogels. Sicherlich besitzt die eingesetzte Dünnschnitt-Technik durch die aufwändige Präparation eine größere Gefahr von Artefak-

ten. Jedoch ist sie besser für die Betrachtung der im Gel immobilisierten Biomasse geeignet, insbesondere bei Kombination mit Färbetechniken (Abbildung 5-2).

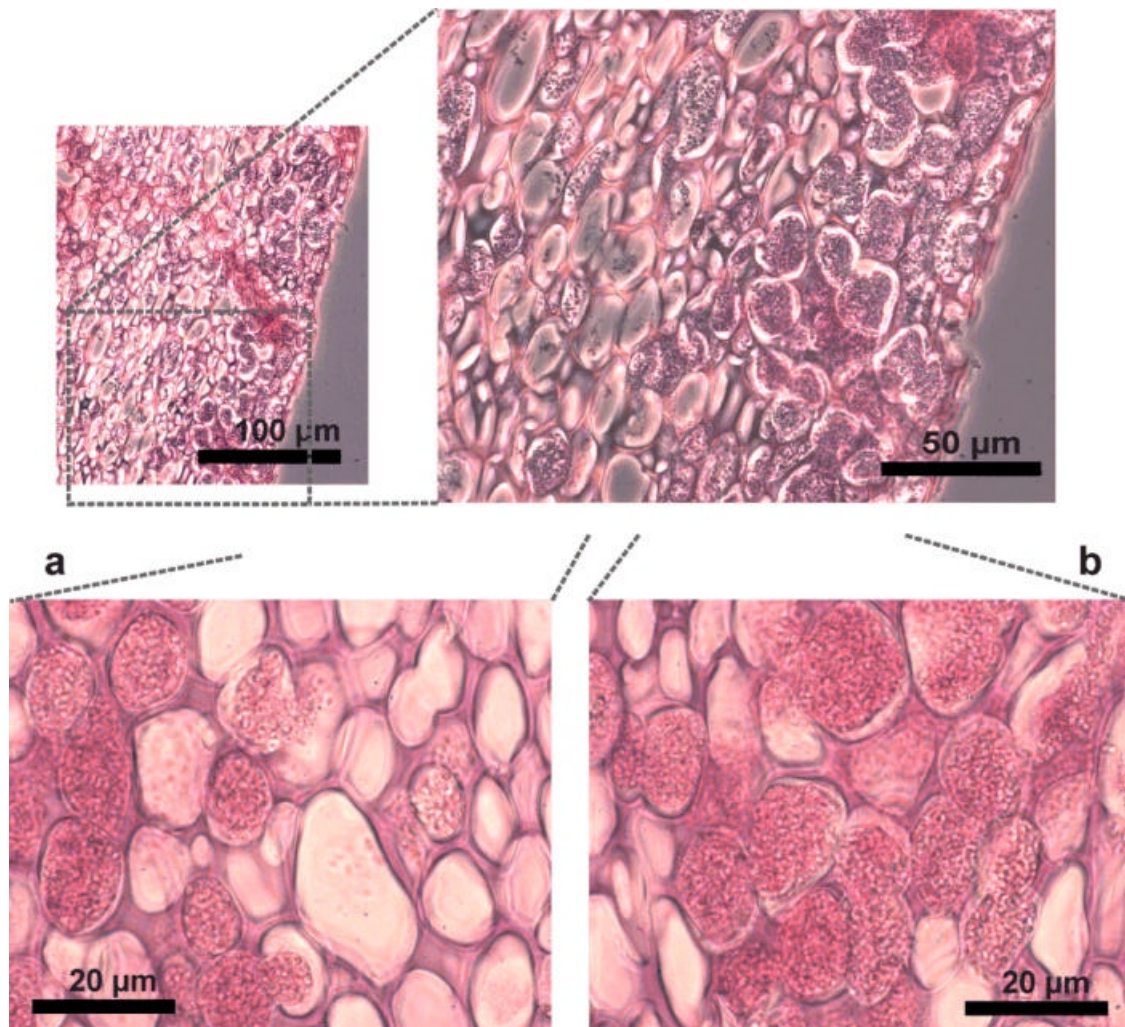


Abbildung 5-2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten von LentiKats® mit *C. butyricum* NRRL B-1024. Dicke der Schnitte: 6 µm. Die Aufnahmen sind bei 200-, 400- und 1000-facher Vergrößerung mit Phasenkontrast entstanden. Deutlich wird die Porenstruktur des PVA-Hydrogels abgebildet.

5.3 Einfache Untersuchung der Stoffdiffusion

Untersuchungen zur Diffusion niedermolekularer Substanzen in PVA-Hydrogelen finden sich beispielsweise bei REMMERS 1992. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden lediglich direkt praxisrelevante Experimente zum Stofftransport in LentiKats® durchgeführt. Dabei wurde untersucht, wie schnell Glycerin und die wichtigsten Produkte im Gelnetzwerk von LentiKats® diffundieren und ob eine Anreicherung im PVA-Hydrogel stattfindet. Insbesondere eine Anreicherung von Produkten wäre problematisch, da dies den Einfluss der Produktinhibierung der Zellen verschärfen würde.

Zunächst wurden LentiKats® mit einer mittleren Masse von etwa 4,9 mg mit dem LentiKat®-Printer hergestellt. Von diesen Gel-Linsen werden 20 g zu je 40 g wässriger Lösungen von Gly-

cerin, PD, Acetat, n-Butyrat sowie Ethanol gegeben und bei einer Rührgeschwindigkeit von 500 min^{-1} gerührt. In größer werdenden Abständen wurden Proben genommen und mit HPLC analysiert. Den Konzentrationsverlauf der verschiedenen Substanzen im ÜS zeigt Abbildung 5-3.

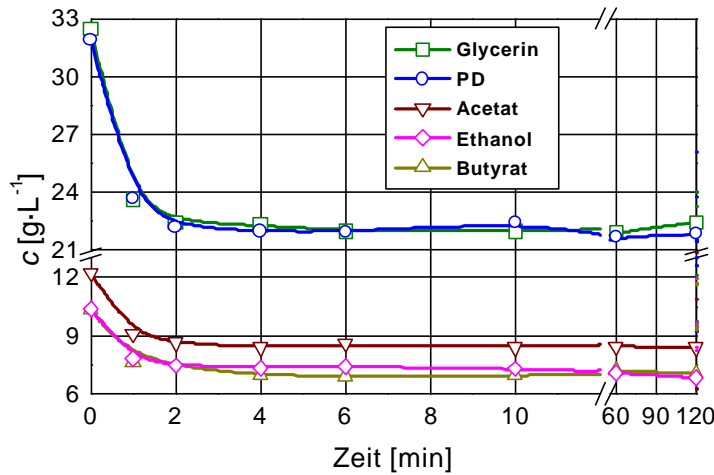


Abbildung 5-3: Zeitlicher Verlauf der Eindiffusion verschiedener Substanzen in LentiKats®. Es wurden jeweils 20 g LentiKats® zu 40 g einer wässrigen Lösung der einzelnen Substanzen gegeben.

Es zeigt sich, dass schon nach 2 bis 4 Minuten in etwa die nach dem Mengenverhältnis von Immobilsaten und Überstand zu erwartende Zielkonzentration erreicht wird. Gleichzeitig zeigt der weitere Verlauf des Experiments, dass sich die untersuchten Substanzen nicht im PVA-Hydrogel anreichern lassen, da nach 120 Minuten die Konzentration im ÜS nicht deutlich unter den Zielwert abgesunken ist.

5.4 Entsorgen von LentiKats®

Bewachsene LentiKats® bestehen aus PVA-Hydrogel-Stegen sowie einem hohen Anteil an Biomasse. Letztere ist natürlich biologisch abbaubar wohingegen das Hydrogel zunächst zerstört, d.h. der PVA wieder gelöst werden muss, um einen Abbau zu ermöglichen.

PVA-Hydrogele werden aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polymerketten ausgebildet. Daher ist durch Temperaturerhöhung ihr Auflösen zu erreichen.

Die Temperaturstabilität des PVA-Hydrogels wurde sowohl für frisch hergestellte zellfreie als auch für ältere LentiKats® mit Biomasse untersucht. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Temperatur	vollständiges Auflösen nach...
90 °C	...3 s
80 °C	...5 s
75 °C	...10 s
65 °C	Auflösen beginnt nach etwa 30 s
60 °C	kein Auflösen bis 90 s, LentiKats® werden etwas weicher

Die Werte zeigen, dass die Gel-Linsen bei Temperaturen von 70 bis 80 °C problemlos aufzulösen sind und so eine Entsorgung vereinfacht wird. Dies bestätigen Experimente von WILLKE *et al.* 2000.

6 Ergebnisse und Diskussion – Thermophile PD-Bildung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der Versuch unternommen, thermophile PD-Bildner zu isolieren und zu charakterisieren. In der Literatur ist die thermophile Umsetzung von Glycerin zu 1,3-Propandiol bislang nicht beschrieben.

48 6.1 Anreicherung und Screening

Im Rahmen eines zweiwöchigen Forschungsaufenthaltes an der TU Hamburg-Harburg wurde eine größere Zahl von Proben auf vorhandene thermophile 1,3-Propandiol-Bildner untersucht. Für Anreicherung und Screening wurde TM1 als selektives Medium benutzt. Unter den mehr als 50 Boden- und Flüssigproben von thermophilen Standorten sowie 5 Reinkulturen thermophiler Mikroorganismen konnte bei insgesamt 21 Proben eine Trübungszunahme festgestellt werden. Bei der Produktanalyse von Proben aus diesen Ansätzen mittels HPLC konnte in fünf Ansätzen die Bildung von 1,3-Propandiol nachgewiesen werden. Nach Überimpfen dieser fünf Ansätze auf frisches Medium wurde jedoch lediglich in einem der Ansätze erneut PD-Bildung gefunden. Die hier vorliegende Propandiol bildende Mischkultur erwies sich als stabil kultivierbar, d.h. durch wiederholtes Überimpfen waren keine signifikanten Veränderungen im Produktspektrum feststellbar. Aus der Mischkultur wurde der thermophile Propandiol bildende Stamm PW1 isoliert. Dieser Stamm bildet bei anaerobem Wachstum auf Glycerin neben PD und Acetat vor allem Ethanol. Die Optimumtemperatur von PW1 liegt bei etwa 55 °C. Für die molare PD-Ausbeute wurden nur recht niedrige Werte von etwa 0,10 bestimmt ($Y' = 0,08$). Wegen dieser verhältnismäßig schlechten Daten wurde PW1 nicht weiter bearbeitet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor allem mit dem aus dem Ausland stammenden Probenmaterial gearbeitet (vgl. 4.1.1). Hierbei wurde meist das modifizierte RCM mit Reinglycerin als Anreicherungsmedium verwendet. Tabelle 6-1 gibt einen Überblick über die durchgeführten Arbeiten.

Tabelle 6-1: Übersicht über die für Anreicherung und Screening herangezogenen Proben, Probenstandorte, verwendete Medien und Glycerinverwertung.

Nr.	Bezeichnung	Art	Herkunft	Probenstandort... ϑ / °C pH/1		Anreicherung auf...	Wachstum	Glycerinverwertung	PD-Bildung
1	IDTF A	s	Indonesien	60	2,6	TM1, RCMPG	-	-	-
2	Cakung 22	s	---	k.A.	k.A.	TM1	+	+	+
3	Cakung 23e	s	---	k.A.	k.A.	TM1, RCMPG	+	+	+
4	Setiabudi	s	---	k.A.	k.A.	TM1, RCMPG	+	+	+
5	ISKG A	s (l)	Island	60	k.A.	RCMPG	+	-	-
6	ISKG B	s	---	k.A.	k.A.	RCMPG	-	-	-
7	ISKG C	s	---	k.A.	k.A.	RCMPG	-	-	-
8	ISDM A	s (l)	---	80	8,5	RCMPG	-	-	-
9	ISDM B	s	---	80-100	2,5	RCMPG	-	-	-
10	ISDM C	s (l)	---	40	8,5	RCMPG	-	-	-
11	ISDM D	s (l)	---	k.A.	k.A.	RCMPG	-	-	-
12	ISJS A	l	---	86	3,5	RCMPG	+	-	-

Nr.	Bezeichnung	Art	Herkunft	Probenstand- ort... ϑ / °C pH/1		Anreicherung auf...	Wachstum	Glycerin- wertung	PD-Bildung
13	ISJS B	s	---	94	4	RCMPG	+	-	-
14	ISJS C	l (s)	---	88	3,3	RCMPG	+	-	-
15	ISJS D	l	---	51	4	RCMPG	+	-	-
16	ITFE A	l	Italien	62	7,1	RCMPG	-	-	-
17	ITFE B	l	---	85	k.A.	RCMPG	+	+	-
18	JPSO A	s, l	Japan	60,8	2,57	TM1, RCMPG	+	-	-
19	JPSO B	s, l	---	45,6	2,51	TM1, RCMPG	-	-	-
20	JPSO C	s, l	---	34,5	2,52	TM1, RCMPG	+	-	-
21	NZBS A	s	Neuseeland	55	k.A.	TM1, RCMPG	+	-	-
22	NZBS B	s	---	86	k.A.	TM1, RCMPG	-	-	-
23	NZBS C	s	---	60	k.A.	TM1, RCMPG	+	+	-
24	NZBS D	s	---	86	k.A.	TM1, RCMPG	+	+	-
25	NZBS E	s	---	60	k.A.	TM1, RCMPG	+	+	-
26	NZBS F	s	---	70	k.A.	TM1, RCMPG	-	-	-
27	PTTR A	s	Azoren	60	5	RCMPG	-	-	-
28	PTTR B	s (l)	---	61	2,5	RCMPG	-	-	-
29	PTTR C	s (l)	---	60	2	RCMPG	(+)	-	-
30	PTTR D	s (l)	---	76	2	RCMPG	-	-	-
31	PTTR E	s (l)	---	94	2	RCMPG	-	-	-
32	PTTR F	s	---	94	2	RCMPG	-	-	-
33	PTTR G	s (l)	---	73	2	RCMPG	-	-	-
34	SKPG A	s	Slowakei	45	7,5	RCMPG	+	+	+
35	Melasse	l	Fa.AMINO	k.A.	k.A.	TM1, RCMPG	+	+	+
36	POME	l	Karlsruhe	46	k.A.	RCMPG	+	-	-
37	Kompo 8	l	eig. Institut	k.A.	k.A.	TM1	+	(+)	(+)
38	Bio/Schlempe 1	l (s)	---	40	k.A.	RCMPG	+	-	-
39	Bio/Schlempe 2	l (s)	---	40	k.A.	RCMPG	(+)	-	-
40	Bio/Schlempe 3	l (s)	---	40	k.A.	RCMPG	-	-	-
41	Bio/Schlempe 4	l (s)	---	40	k.A.	RCMPG	-	-	-
42	Bio/Schlempe 5	l (s)	---	40	k.A.	RCMPG	(+)	-	-
43	Bio/Schlempe 6	l (s)	---	40	k.A.	RCMPG	+	+	+
44	Schlempe	l (s)	---	40	k.A.	RCMPG	+	+	+
45	Gülle B +55 °C	l (s)	---	55	k.A.	TM1, RCMPG	+	+	+
46	Gülle M	l (s)	---	k.A.	k.A.	RCMPG	+	-	-
47	Yosemite-IS1	s (l)	USA	22	6,5	RCMPG, TM1	+	+	+
48	Yosemite-IS2	s (l)	---	k.A.	7,5	RCMPG	+	-	-
49	Yosemite-IS3	s (l)	---	24	6,5	RCMPG	+	-	-
50	Yosemite-IS4	s (l)	---	47	6,5	RCMPG	-	-	-
51	Yosemite-IS5	s (l)	---	k.A.	7,5	RCMPG	+	-	-
52	Yosemite-IS6	s (l)	---	k.A.	k.A.	RCMPG	+	-	-

Nr.	Bezeichnung	Art	Herkunft	Probenstand- ort...		Anreicherung auf...	Wachstum	Glycerinver- wertung	PD-Bildung
				Ø / °C	pH/1				
53	Yosemite-IS7	s (l)	---	k.A.	k.A.	RCMPG	+	-	-
54	SANP	s (l)	Nepal	43	7,2	RCMPG	(+)	-	-
55	SANP	s (l)	---	41	7,2	RCMPG	+	-	-
56	SANP	s (l)	---	41	7,2	RCMPG	+	-	-
57	SANP	s (l)	---	41	7,2	RCMPG	(+)	(+)	(+)
58	SANP	s (l)	---	21	7,2	RCMPG	(+)	-	-
59	SANP	s (l)	---	44	6,5	RCMPG	+	-	-
60	SANP	s (l)	---	43	6,5	RCMPG	+	-	-
61	IS-J2 11	s (l)	Island	k.A.	k.A.	RCMPG	(+)	-	-
62	IS-J4 12	s (l)	---	k.A.	k.A.	RCMPG	+	+	+

Bedeutung der Symbole: s = fest, l = flüssig, s (l) = Feststoff mit Flüssigkeit, l (s) = Flüssigkeit mit Feststoff, + = bewachsen, '-' = nicht bewachsen, '(+)' = schwach bewachsen

Für die große Mehrzahl der Anreicherungsansätze wurde eine Inkubationstemperatur von 60 °C gewählt. Zum einen fallen glycerinhaltige Produktströme aus fettverarbeitenden Betrieben im Bereich dieser Temperatur an. Zum anderen ist ein Wachstum von kontaminierenden Pilzen praktisch ausgeschlossen. Gleichzeitig ist die Temperatur nicht so hoch, dass man befürchten müsste, nur sehr wenige thermophile MO anreichern zu können.

Die Übersichtstabelle (Tabelle 6-1) zeigt, dass bei vielen Proben eine anaerobe thermophile Glycerinverwertung festgestellt wurde. Jedoch konnte nur bei wenigen Ansätzen die Bildung von 1,3-Propandiol in der HPLC-Analytik nachgewiesen werden. Bei diesen „positiven“ Ansätzen wurde versucht, die thermophilen PD-Bildner, d.h. die Anreicherungskultur sukzessive auf TM1 zu überimpfen, um so die ursprünglich durch das Probenmaterial eingebrachten komplexen Bestandteile auszudünnen und auf ein definiertes Medium zu wechseln.

Von den wenigen Ansätzen, in denen Bildung von 1,3-Propandiol mit HPLC nachgewiesen werden konnte, ließ sich lediglich die Mischkultur aus Anreicherungsansatz 3 stabil auf TM1 weiterkultivieren. Mit dem in 4.1.2 vorgestellten Verfahren zur Gewinnung von Reinkulturen war der Propandiol bildende Stamm aus der Mischkultur zunächst nicht zu isolieren, da sich stets ein weitgehend geschlossener Zellrasen auf den Nährböden bildete. Auch durch Einsatz des KOCHSchen Plattengussverfahrens (NÄVEKE UND TEPPER 1982) konnten zwar Einzelkolonien gewonnen werden, jedoch zeigten die daraus isolierten Kolonien keine PD- sondern fast ausschließlich Ethanolbildung. Dennoch zeigt die Kultur PW2 bei der mikroskopischen Untersuchung ein recht homogenes Aussehen. Bei anaerober Kultivierung von PW2 auf Glycerin werden neben 1,3-Propandiol als Nebenprodukte n-Butyrat, Acetat und nur sehr geringe Mengen an Ethanol gebildet. Die Kultur verhält sich damit ähnlich wie etwa *C. butyricum*. Bei Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle wurde praktisch das gleiche Spektrum an gebildeten Nebenprodukten beobachtet, was auf das Vorliegen einer Reinkultur hindeutete.

6.2 Untersuchungen mit der thermophilen Kultur PW2

Praktisch alle Untersuchungen mit PW2 wurden in 50- oder 100-mL-Injektionsvials mit TM1 durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden 10 g · L⁻¹ Reinglycerin als C-Quelle ein-

gesetzt. Alle Versuche wurden mit einem Start-pH-Wert von 7,0 und mit Ausnahme der Experimente zum Temperaturoptimum bei einer Temperatur von 60 °C durchgeführt.

Die praktische Arbeit mit thermophilen, anaeroben Mikroorganismen ist schwierig und aufwändig. Vor allem bei den Versuchen in Injektionsvials sind bei zumutbarem Aufwand nicht alle Parameter verlässlich kontrollierbar. Dies gilt beispielsweise für mögliches unterschiedliches Abkühlen der Spritze beim Überimpfen oder unterschiedliches Vorwärmen der Vials. Durch die festgestellte Bedürftigkeit der untersuchten thermophilen Mikroorganismen an komplexen Medienbestandteilen, z.B. Hefeextrakt, (s.u.) sind die Versuche zudem stärker von der Lagerungsdauer der vorbereiteten Vials mit Medium abhängig. Für die Ansätze einer Versuchsreihe wurde daher darauf geachtet, Vials mit Medium einer Charge zu verwenden und das Beimpfen möglichst gleichmäßig durchzuführen. Wenigstens diese Ansätze sind dann untereinander vergleichbar. Gleiches gilt nur bedingt für die in den verschiedenen Versuchen erzielten Absolutwerte.

Temperaturoptimum

Die Untersuchungen zum Temperaturoptimum von PW2 (Abbildung 6-1) zeigen, dass es sich um einen echten thermophilen 1,3-Propandiolbildner handelt.

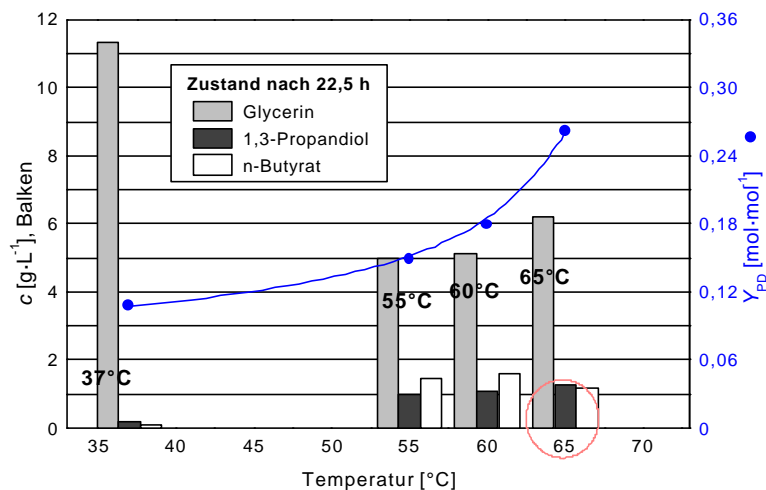


Abbildung 6-1: Untersuchung zum Temperaturoptimum von PW2.

Medium TM1 mit 10 g·L⁻¹
Reinglycerin, pH 7,0,
 $V_R = 20$ mL.

Bei einer Temperatur von 37 °C ist praktisch keine Aktivität der Zellen festzustellen. Im Bereich von 55 und 60 °C wächst PW2 am besten und Glycerin wird am schnellsten abgebaut. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur auf 65 °C wurde eine geringere Bildung von n-Butyrat und damit einhergehend eine signifikant gesteigerte Ausbeute für 1,3-Propandiol beobachtet. Möglicherweise liegt der Optimumsbereich der PD-Bildung noch oberhalb von 65 °C. Jedoch wurde ein erweiterter Temperaturbereich mit PW2 zunächst nicht untersucht.

Der optimale Temperaturbereich für die PD-Bildung liegt oberhalb dessen für ein optimales Wachstum. Beim Einsatz bereits dicht besiedelter Immobilisate könnte die optimale Temperatur für die PD-Bildung und nicht die für das Zellwachstum gewählt werden. Gleichzeitig würde das Wachstum von Zellen außerhalb der Immobilisate gebremst. Zudem senkt die geringere Produktion von n-Butyrat den Aufwand für die Neutralisation.

Substratkonzentration

Es wurden mit 10 und 50 g·L⁻¹ zwei verschiedene Glycerinkonzentrationen untersucht. Hierbei wurden keine Unterschiede bei der PD-Bildung festgestellt.

Untersuchungen zur Zusammensetzung des Mediums

Verglichen mit den mesophilen Stämmen von *K. pneumoniae* und *C. butyricum* ist die Produktivität des thermophilen PD-Bildners PW2 bescheiden. Zudem ist die PD-Ausbeute geringer. Daher wurde versucht, vorhandene Komponenten im Medium zu variieren und andere Mediumszusätze zu untersuchen.

Hefeextrakt

52 Hefeextrakt (HE) kommt zwar aus Kostengründen als Zusatzstoff für den angestrebten Prozess kaum in Frage. Dennoch wurde untersucht, ob hierin enthaltene Komponenten essentiell oder limitierend sind. Parallelansätze mit 0, 3 und 6 g·L⁻¹ HE wurden untersucht (Standard: 3 g·L⁻¹). Eine Verdopplung des HE führte zu einer geringfügigen Steigerung der PD-Bildung. Im Ansatz *ohne HE* konnte *keine* Aktivität festgestellt werden. Dies bedeutet, dass im HE Komponenten enthalten sind, die für den anaeroben Glycerinstoffwechsel von PW2 unerlässlich sind.

Spurenelemente

Durch Erhöhung der Spurenelementkonzentration um das Fünffache konnte eine 10 bis 20 % höhere PD-Bildung erzielt werden. Dies weist auf eine Limitierung durch eine in der SL enthaltene Komponente hin. Dies sollte beim Erreichen höherer Biomassekonzentrationen, insbesondere bei der Kultivierung immobilisierter Zellen, berücksichtigt werden.

Makronährelemente NH₄⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺

Es konnte keine Limitierung der Zellen mit N, Ca oder Mg in den Testansätzen festgestellt werden. Die jeweils beobachtete PD-Bildung unterscheidet sich praktisch nicht von der im Ansatz mit normalem TM1.

Vitaminlösung

Durch fünffache Konzentration der Vitamine in TM1 ließ sich die Bildung von PD deutlich steigern. Jedoch ist der Einsatz von reinen Vitaminen in einem technischen Prozess zur Herstellung von *bulk*-Chemikalien utopisch. Eventuell kann nach Identifizierung des verantwortlichen Vitamins ein billiger Zusatzstoff gefunden werden, der reich an diesem Vitamin ist.

Verwertung von Rohglycerin

Der Vergleich von Rein- und Rohglycerin wurde bei einer Konzentration von jeweils etwa 10 g·L⁻¹ durchgeführt. Mit Rohglycerin war keine Aktivitätseinbuße feststellbar, d.h. eine Verwertung durch PW2 ist grundsätzlich möglich (Abbildung 6-2).

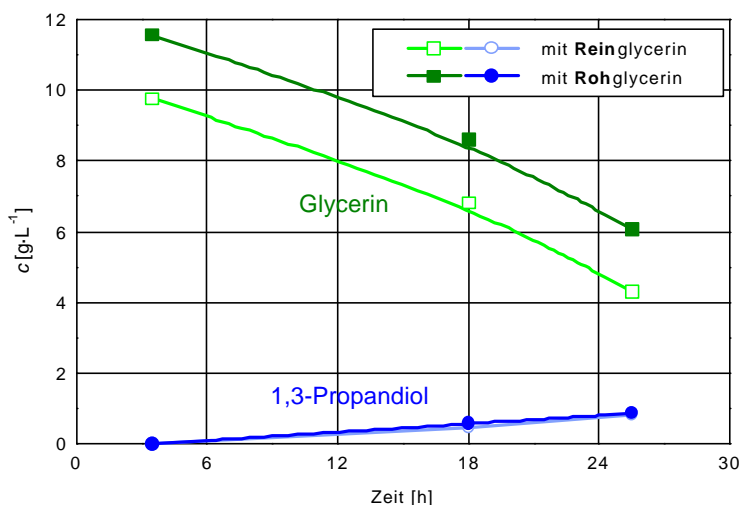


Abbildung 6-2: Vergleich der Verwertung von Rein- und Rohglycerin mit PW2

Medium: TM1, je etwa 10 g·L⁻¹
Glycerin, pH 7,0, $J = 60$ °C,
 $V_R = 30$ mL

Verwertung von Glucose

Bei anaerober Kultivierung von PW2 auf einem Medium, das je etwa $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glycerin und Glucose enthielt, wird Glucose verwertet und es wurden dabei n-Butyrat und Acetat gebildet. Dahingegen wurde weder PD-, Lactat- noch Ethanolbildung beobachtet. Das Produktspektrum ist demnach bei Wachstum auf Glucose sehr ähnlich dem auf Glycerin. Dies spricht dafür, dass in der Mischkultur PW2 der Propandiol bildende thermophile MO, der n-Butyrat und Acetat als Nebenprodukte bildet, praktisch in Reinform vorliegt. Eine andere Möglichkeit ist, dass der eventuell vorhandene Ethanolbildner, der sich noch während der Versuche zur Isolierung im KOCHschen Plattengussverfahren zeigte, keine Glucose verwerten kann. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich (vgl. 6.1).

Verkürzung der lag-Phase, pH-Wert-Optimierung

Bei Kultivierung von PW2 auf TM1 wurde stets eine etwa eintägige lag-Phase beobachtet. Dies wurde auf die Sensitivität der Zellen gegenüber dem Stress des Überimpfens, z.B. neues Medium mit höherem pH-Wert, leichte Abkühlung oder geringfügigen Sauerstoffzutritt, zurückgeführt. Nach der ausgedehnten lag-Phase folgte stets eine verhältnismäßig rasche Glycerinumsetzung, die jedoch bald zum Stillstand kam. Hierfür war das starke Abfallen des pH-Wertes verantwortlich. Es wurden zwei Möglichkeiten untersucht, um in den nicht pH-kontrollierten Vials zu einer besseren Umsetzung des Glycerins zu kommen. Zum einen durch Erhöhung der Pufferkapazität bei Verdreifachung der Phosphatkonzentration, zum anderen durch einen höheren Start-pH-Wert von 7,5 statt 7,0 (pK_S -Wert von Phosphat 7,2), wodurch eine bessere Nutzung der Pufferung erzielt werden sollte. Entgegen der Erwartung verlängerte sich bei Erhöhung der Phosphatkonzentration die lag-Phase. Bei einem Start-pH-Wert von 7,5 wurde keine Glycerinumsetzung beobachtet. Daraus wurde geschlossen, dass der übliche Start-pH-Wert von 7,0 zu hoch lag und die lange lag-Phase dadurch entstand, dass die Zellen erst gegen die Pufferwirkung arbeiten und sich ihren optimalen Start-pH-Wert einstellen müssen.

Um den optimalen Start-pH-Wert zu ermitteln, wurden in den Vials unterschiedliche pH-Werte eingestellt. Für die Pufferung aller Ansätze wurde statt Phosphat 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) gewählt. Der pK_S -Wert liegt hier inmitten des untersuchten Bereiches bei 6,1. Zwar ist die Pufferwirkung unterschiedlich, doch sollten dennoch Aussagen über den günstigsten Start-pH-Wert möglich sein. Das Ergebnis des Experiments zeigt Abbildung 6-3.

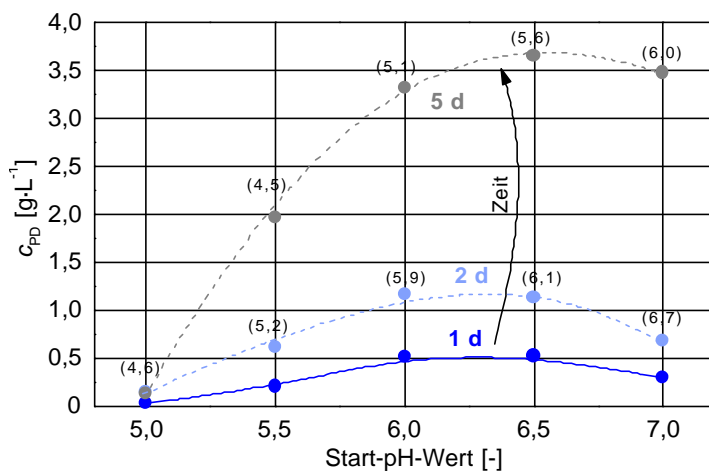


Abbildung 6-3: Untersuchung zum pH-Wert-Optimum von PW2. Gezeigt ist die nach 1 d, 2 d und 5 d gebildete PD-Konzentration. Die Werte in Klammern geben die zum Zeitpunkt der Probenahme gemessenen pH-Werte an.

Medium TM2 mit $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Reinglycerin, $J = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_R = 25 \text{ mL}$.

Der Verlauf der PD-Bildung nach 1 d zeigt deutlich, dass der optimale Start-pH-Wert unterhalb von 7,0 liegt. Erst nach 5 d schließt der Ansatz wegen der geringen Pufferung und dem erreich-

ten pH-Abfall zu den Ansätzen 6,5 und 6,0 auf. Bei Werten zwischen 6,0 und 6,5 ist nach einem Tag die größte PD-Menge gebildet worden, d.h. der optimale pH-Wert liegt in diesem Bereich. Bei einem niedrigen pH-Wert von 5,5 vermag PW2 noch PD zu bilden. Dahingegen ist 5,0 offenbar bereits inhibitorisch – auch nach 5 d wurde hier kein PD gebildet.

Aufgrund dieses Experiments wurde fortan für die Kultivierung von PW2 ein Start-pH-Wert von 6,5 gewählt und MES als Puffersubstanz.

Basierend auf den Experimenten zur Charakterisierung von PW2 wurden mehrere *batch*-Fermentationen mit dieser Kultur in TM2 durchgeführt. Zielsetzung war, die optimalen Kultivierungsbedingungen weiter zu identifizieren, das Kultivierungsmedium zu optimieren und die Leistungsfähigkeit des thermophilen Stammes zu ermitteln.

Die durchgeführten Fermentationen bauten zum Teil direkt aufeinander auf, d.h. ein Teil der bewachsenen Fermenterbrühe wurde als Inokulum der Folgefermentation verwendet. Im Verlauf dieser Fermentationen wurde keine reproduzierbare oder stabile PD-Bildung durch PW2 beobachtet. Insbesondere wurde eine Verschiebung der Nebenprodukte von n-Butyrat in Richtung von Ethanol als wichtigster Komponente neben PD beobachtet. Teilweise wurden bei paralleler Beimpfung von Vials und einem Fermenter mit derselben Vorkultur sehr unterschiedliche Produktspektren beobachtet – mit dem Schwerpunkt auf n-Butyrat im Vial und Ethanol im Fermenter. Vermutungen über einen einfachen Zusammenhang der Nebenprodukte mit der Konstanthaltung des pH-Wertes im Fermenter konnten nicht bestätigt werden.

Um den möglichen Einfluss eines eventuell vorhandenen Ethanol bildenden Stammes auszuschließen, wurde erneut – diesmal mit Erfolg – versucht, die Kultur PW2 über Ausplattierung auf TM2-Nährböden aufzureinigen. Die nach mehrfachem Überimpfen entstandenen Einzelkolonien wurden in Flüssigkultur auf PD-Bildung untersucht. Der leistungsfähigste Stamm AT1 wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

6.3 Kultivierung des thermophilen Stammes AT1

Für die Kultivierung des aus der Kultur PW2 hervorgegangenen Stammes AT1 wurde ausschließlich TM2 verwendet, d.h. anstelle des mit Phosphat gepufferten TM1 wurde nun ausschließlich mit MES gepuffert. Neben PD wird bei der anaeroben Verwertung von Glycerin vor allem Ethanol und nur wenig n-Butyrat gebildet. Die Bildung von Acetat ist leider bei Verwendung von MES als Puffersubstanz schwer kontrollierbar, da diese beiden Substanzen in der routinemäßig verwendeten HPLC-Analytik praktisch die gleiche Retentionszeit zeigen.

6.3.1 Untersuchungen freier Zellen von AT1 im Injektionsvial

Grundlegende Untersuchungen zur Kultivierung von AT1 wurden in Injektionsvials meist bei einem Volumen von 10 bis 30 mL durchgeführt. Die Ansätze waren in der Regel nicht pH kontrolliert. Durch eine höhere Pufferung wurde der pH-Wert möglichst lange in einem günstigen Bereich gehalten. Für die praktische Arbeit mit AT1 im Injektionsvial gilt das gleiche wie bereits für die Kultivierung von PW2 (vgl. 6.2).

Temperaturoptimum

Das Optimum der Kultivierungstemperatur für AT1 wurde in sieben parallelen Ansätzen in den Abstufungen 37 – 55 – 58 – 60 – 62 – 65 – 69 °C untersucht (Abbildung 6-4).

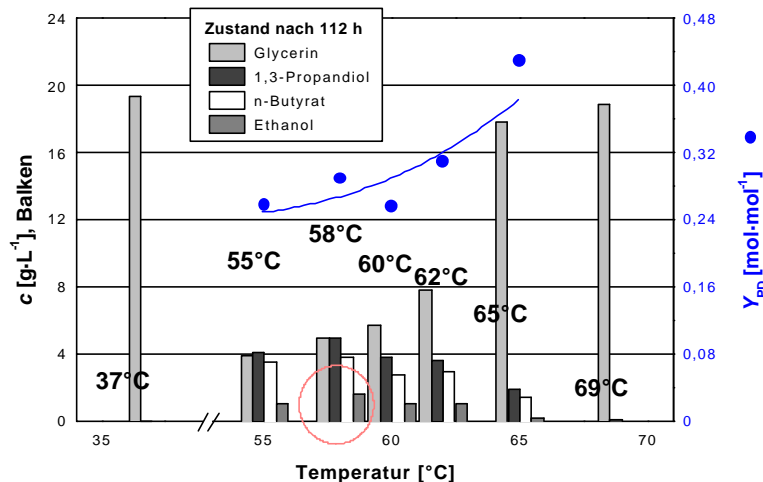


Abbildung 6-4: Untersuchung zum Temperaturoptimum von AT1.

Medium TM2 mit 20 g·L⁻¹ Reinglycerin, pH 6,5, $V_R = 30$ mL.

55

Unter mesophilen Bedingungen bei 37 °C wurden weder Wachstum noch PD-Bildung beobachtet. Das Optimum für die Kultivierungstemperatur liegt bei etwa 58 °C. Schon bei 3 K weniger bzw. 2 K mehr werden Einbußen festgestellt. Im vorliegenden Experiment wurde wenig Ethanol und hauptsächlich n-Butyrat als Nebenprodukt gebildet. Entsprechend hoch sind die molaren PD-Ausbeuten mit Werten von bis zu 0,40 ($Y' = 0,33$). Wie schon bei den Untersuchungen mit PW2 lässt sich ein positiver Einfluss einer höheren Kultivierungstemperatur auf die Ausbeute für PD feststellen.

Aus Sicht einer hohen PD-Bildungsaktivität ist eine Temperatur von 58 °C optimal, für eine hohe PD-Ausbeute sind höhere Temperaturen vorteilhaft. Für die nachfolgenden Experimente wurde die Temperatur meist zwischen 58 und 60 °C gewählt.

pH-Wert-Optimum

Bereits in den Experimenten mit PW2 hatte sich gezeigt, dass der pH-Wert einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität der Zellen hat. Das pH-Wert-Optimum für den durch Aufreinigung dieser Kultur entstandenen Stamm AT1 wurde für den Bereich von pH 5,6 bis pH 6,6 untersucht. Abbildung 6-5 zeigt die Entwicklung der PD-Bildung in sechs Vial-Ansätzen bei unterschiedlichem Start-pH-Wert.

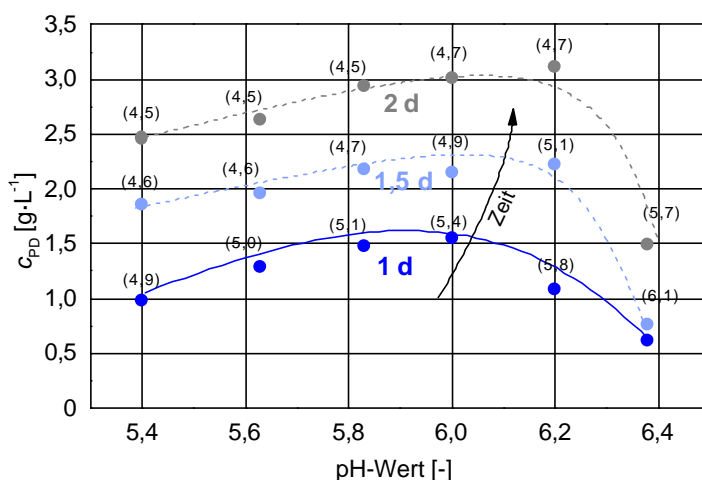


Abbildung 6-5: Untersuchung zum pH-Wert-Optimum von AT1. Gezeigt ist die nach 1 d, 1,5 d und 2 d gebildete PD-Konzentration. Die Werte in Klammern geben die zum Zeitpunkt der Probenahme gemessenen pH-Werte an.

Medium TM2 mit 20 g·L⁻¹ Reinglycerin, $J = 60$ °C, $V_R = 30$ mL.

Der pH-Wert in den Ansätzen wurde nicht durch Zugabe von Lauge stabil gehalten. Lediglich die Pufferung mit MES (pK_s -Wert 6,1) verhindert ein noch schnelleres Absinken. Nach dem Verlauf der 1 d Kurve liegt das pH-Wert-Optimum bei etwa 6,0. Die weitere Kultivierung der Ansätze

ze zeigt, dass oberhalb von 6,2 die Aktivität von AT1 deutlich behindert ist. Erst als nach anderthalb Tagen der pH-Wert auf etwa 6,1 abgesunken ist, setzt die PD-Bildung ein. Am unteren Ende des untersuchten Bereiches zeigt sich, dass AT1 auch bei recht niedrigen Werten von unter 5,6 eine gute Aktivität aufweist. Der Ansatz mit einem Start-pH-Wert von 5,4 zeigt auch nach anderthalb Tagen trotz eines pH-Wertes von 4,6 noch deutliche Aktivität. Ein signifikanter Einfluss des pH-Wertes auf die Produktverteilung im allgemeinen und die PD-Bildung im speziellen konnte nicht festgestellt werden.

Einfluss der Glycerinkonzentration

Einerseits wirkt Glycerin ab einer bestimmten Menge inhibierend, andererseits muss zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Substratversorgung der Zellen eine gewisse Mindestkonzentration an Glycerin im Medium vorhanden sein. Daher ist die Untersuchung des Einflusses der Glycerinkonzentration auf die Aktivität von AT1 wichtig. Abbildung 6-6 verdeutlicht die Abhängigkeit der PD-Bildung von der Substratkonzentration.

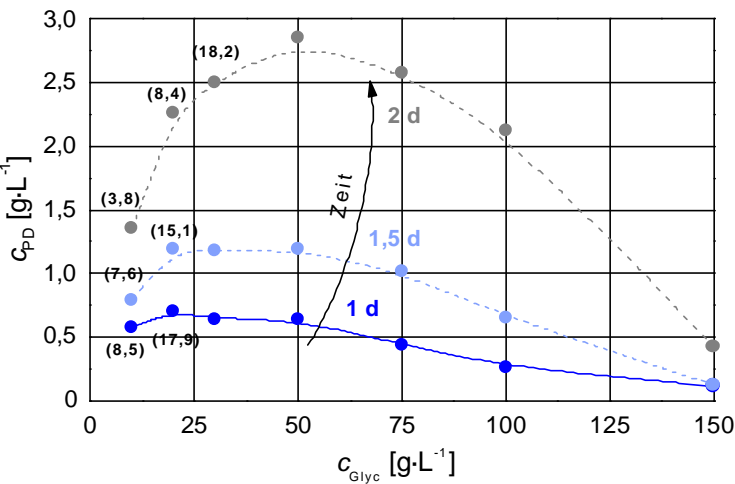


Abbildung 6-6: Einfluss der Glycerinkonzentration auf die PD-Bildung von AT1. Gezeigt ist die nach 1 d, 2 d und 5 d gebildete PD-Konzentration. Die Werte in Klammern geben die zum Zeitpunkt vorhandene Restkonzentration an Glycerin in g· L⁻¹ an.

TM2 mit 20 g· L⁻¹ Reinglycerin, J = 60 °C, V_R = 30 mL.

Nach einem Tag ist die PD-Bildung in den Ansätzen mit anfänglich 20 bis 50 g· L⁻¹ Glycerin am weitesten vorangeschritten. Dieses Bild festigt sich nach 1,5 und nach 2 Tagen. Bei der Betrachtung muss berücksichtigt werden, dass die Glycerinkonzentration nicht konstant gehalten wird. Nach anderthalb Tagen fällt so der 20 g· L⁻¹ Ansatz hinter den 30 g· L⁻¹ Ansatz zurück. AT1 kann noch bei Glycerinkonzentrationen von 150 g· L⁻¹ wachsen und PD produzieren, wenngleich auch erst nach einer Adaptationsphase von zwei Tagen.

Die Ergebnisse der Untersuchung deuten auf eine hohen k_S-Wert für Glycerin hin. Als Ursachen kommen ein hoher k_S-Wert eines Schlüsselenzyms, z.B. der Glycerindehydratase, oder Transportwiderstände über die Zellmembran in Frage. Ein hoher k_S-Wert ist für die angestrebte Nutzung eines Bakterienstammes ungünstig. Zum einen ist für die Aufreinigung der Produktbrühe eine möglichst vollständige Umsetzung des Glycerins wünschenswert, zum anderen kommen bei Immobilisierung der Zellen eventuelle Transportwiderstände stärker zum Tragen. Einen Einfluss der Glycerinkonzentration auf die PD-Ausbeute verdeutlicht Tabelle 6-2.

Tabelle 6-2: Einfluss der Glycerinkonzentration auf die PD-Konzentration und -Ausbeute sowie die Konzentrationen der gebildeten Nebenprodukte Ethanol und n-Butyrat nach jeweils zwei Tagen.

Nebenprodukt	anfängliche Glycerinkonzentration [g· L ⁻¹]						
	10	20	30	50	75	100	150
c _{But} [g· L ⁻¹]	0,5	1,2	1,7	2,5	2,2	1,3	(n.a.)

$c_{\text{EtOH}} [\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$	1,2	1,4	1,2	0,9	1,0	1,0	0,4
$c_{\text{PD}} [\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$	1,4	2,3	2,5	2,8	2,6	2,1	0,4
$Y_{\text{PD}} [\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}]$	0,18	0,20	0,22	0,27	0,25	0,44	k.A.

Die Daten zeigen, dass mit steigender Glycerinkonzentration die Bildung von n-Butyrat gegenüber der Bildung von Ethanol favorisiert wird. Gleichzeitig steigt Y_{PD} leicht an. Dies wird insbesondere für den Bereich von c_{Glyc} unterhalb $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ deutlich.

Einfluss verschiedener Nährstoffe, komplexer Medienbestandteile

Die Produktivität des thermophilen Stammes AT1 schneidet im Vergleich mit den beiden mesophilen Stämmen von *K. pneumoniae* und *C. butyricum* schlecht ab. Wiederum wurde versucht, den Gehalt an bereits vorhandenen Komponenten im Medium zu erhöhen und den Effekt alternativer Mediumszusätze zu testen.

Hefeextrakt und andere komplexe Medienbestandteile

Ein Mehr an Hefeextrakt (HE) wirkt sich positiv aus. Eine Verdopplung der Konzentration auf $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Standard: $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) resultiert in einer etwa 20 % höheren PD-Bildung. Eine weitere Steigerung auf $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ wirkt sich nur noch geringfügig aus. Eine oder mehrere Komponenten im HE sind den Ergebnissen zufolge im Standard TM2 um etwa einen Faktor 2 zu wenig vorhanden.

Eine Ergänzung des HE durch eine gleiche Menge an Maisquellwasser von $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ führt zu einer Steigerung der PD-Bildung um etwa 30 %. Die Zugabe von noch mehr Maisquellwasser hingegen führt zu keiner weiteren Verbesserung. Dennoch sind offenbar wie im HE Komponenten enthalten, die das Wachstum im einfachen TM2 limitieren. Als weitere komplexe Medienbestandteile wurden Pepton (Riedel-de-Haën, Seelze) und RCM (Oxoid, Wesel) untersucht. Zusätzliche $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Pepton zeigten praktisch keine Wirkung, wohingegen durch $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ RCM die PD-Bildung am zweiten Tag der Inkubation um etwa 50 % gesteigert wurde. Sowohl Pepton als auch RCM führen in diesem Zeitraum einer gesteigerten Bildung von n-Butyrat. Anders als Pepton enthält RCM größere Mengen an Kohlenhydraten (15 % Glucose, 3 % Stärke). Eine Funktion dieser Kohlenhydrate als Co-Substrat, d.h. als C-Quelle für die Bildung von Biomasse und Gewinnung von Energie, bei gleichzeitig weitgehender Nutzung von Glycerin für die PD-Bildung konnte nicht festgestellt werden. Die auf Glycerin bezogene Ausbeute an 1,3-Propandiol war nicht signifikant erhöht.

Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurden Versuche mit verschiedenen Kohlenhydraten als mögliche Co-Substrate durchgeführt.

Kohlenhydrate als mögliche Co-Substrate

Die Zugabe von Kohlenhydraten als mögliche Co-Substrate kann sich positiv auf die PD-Ausbeute auswirken (vgl. 3.1.2). Mit AT1 wurden Glucose, Saccharose sowie Stärke als Co-Substrate getestet.

In verschiedenen Ansätzen wurde Glycerin mit $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ und gleichzeitig jeweils eine der anderen drei C-Quellen mit ebenfalls $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ eingesetzt. Stärke wurde von AT1 nicht als Substrat verwertet. Glycerin wurde bei dieser Konzentration von Glucose und Saccharose nicht umgesetzt. Hierfür dürften Diauxie-Effekte verantwortlich sein, d.h. die Kohlenhydrate werden zu schnell umgesetzt und der dadurch hervorgerufene niedrige pH-Wert verhindert die Glycerinumsatzung. In Ansätzen mit der halben Konzentration von Glucose oder Saccharose ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) wurde hingegen Glycerinverwertung und PD-Bildung beobachtet. Leider wurde nur eine geringe absolute Mengen an 1,3-Propandiol gebildet, sodass die molaren PD-Ausbeuten von 0,55

für den Glucose- und 0,51 für den Saccharoseansatz im Vergleich zum Referenzansatz mit 0,31 nur bedingte Aussagekraft besitzen.

Untersuchungen zur parallelen Verwertung von Glycerin und Kohlenhydraten durch AT1 sind offenbar stark von deren absoluter Mengen und Verhältnis abhängig. Eine weitergehende Untersuchung ist daher nur im kontinuierlich betriebenen Fermenter sinnvoll.

Spurenelemente und Nährsalze

Um festzustellen, ob Komponenten der Spurenelementlösung (SL) oder weitere im Medium enthaltene Nährsalze die beobachtete PD-Bildung von AT1 limitieren, wurden in parallelen Ansätzen normales TM2, TM2 mit doppelter SL-Zugabe sowie TM2 mit doppelter Konzentration aller enthaltenen Nährsalze (ohne SL) mit AT1 beimpft und verglichen. Das Resultat zeigt Abbildung 6-7.

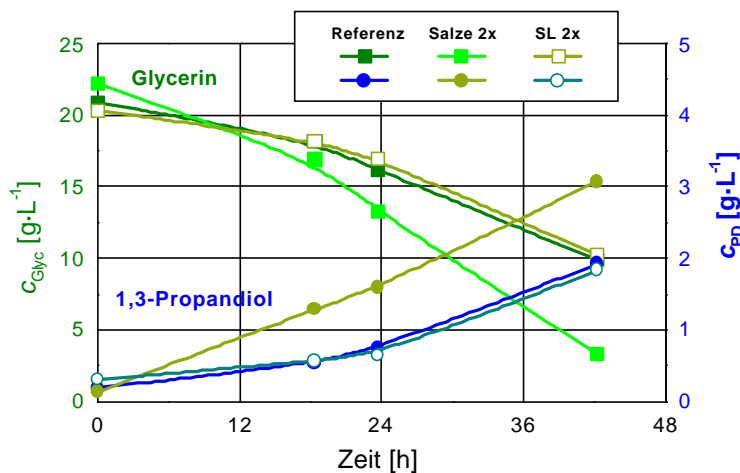


Abbildung 6-7: Untersuchung des Einflusses der SL- und Nährsalzkonzentration auf die PD-Bildung von AT1.

Medium TM2 mit Reinglycerin, pH 6,5, $J = 60$ °C, $V_R = 30$ mL.

Es zeigt sich, dass Komponenten aus der SL offenbar nicht limitierend sind. Dagegen bewirkt eine Verdopplung der übrigen Nährsalze eine deutliche Verbesserung der PD-Bildung. Nach einem Tag wurde etwa die doppelte Menge an PD gebildet. Verschiedene Ursachen sind zu erkennen: Zum einen setzt die PD-Bildung früher ein, zum anderen ist die Aktivität etwas höher. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde insbesondere bei den folgenden Fermentationen die Konzentration der Nährsalze heraufgesetzt.

Verwertung von Rohglycerin

Wie PW2 konnte auch AT1 Rohglycerin aus der Biodieselherstellung (Oelmühle Connemann, Leer) ohne Einbußen verwerten. Bei Verwendung einer Charge dieses Rohglycerins wurde keine Umsetzung beobachtet. Diese Charge erwies sich jedoch auch bei Verwendung mit dem mesophilen Stamm *C. butyricum* NRRL B-1024 als problematisch (7.1.3).

Produktinhibierung

Die Inhibierung durch PD und Nebenprodukte der anaeroben Glycerinumsetzung spielt bei mesophilen PD-Bildnern eine gewichtige Rolle (ZENG *et al.* 1994, REIMANN A *et al.* 1998a). Aus diesem Grunde wurde untersucht, inwieweit Produktinhibierung für das frühe Abbrechen der PD-Bildung in den mit AT1 durchgeführten Fermentationen, verantwortlich sein kann.

Um die Toleranz von AT1 gegenüber PD sowie Ethanol und n-Butyrat zu überprüfen, wurde die PD-Bildung in TM2 mit unterschiedlichen Konzentrationen jeweils einer dieser Substanzen getestet. Die Ergebnisse der drei Versuchsreihen wurden zur besseren Vergleichbarkeit normiert und sind in Abbildung 6-8 dargestellt.

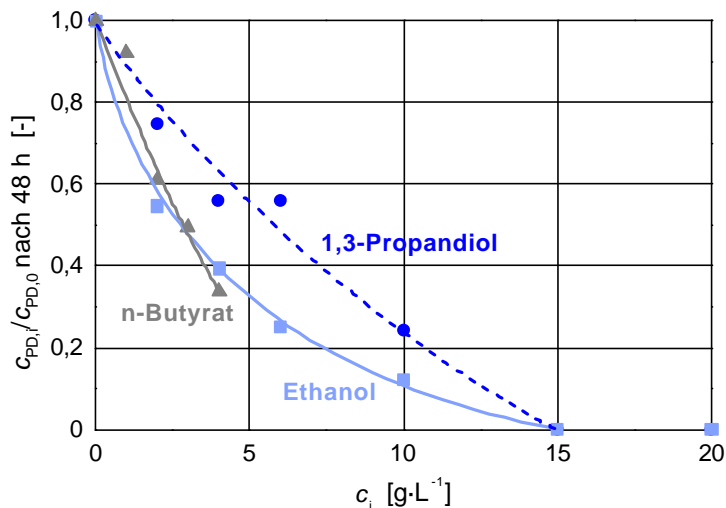


Abbildung 6-8: Abhängigkeit der PD-Bildung mit AT1 bei Zugabe von Ethanol, n-Butyrat oder weiterem PD nach 48 h.

Medium TM2 mit Reinglycerin, pH 6,5, $J = 60$ °C, $V_R = 30$ mL.

59

Alle drei Kurven zeigen einen deutlichen inhibitorischen Effekt schon bei relativ geringen Konzentrationen. Die inhibitorische Wirkung der Nebenprodukte (NP) n-Butyrat und Ethanol scheint dabei stärker zu sein als die des 1,3-Propandiols. AT1 ist nicht in der Lage, bei mehr als etwa $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ vorgelegtem PD weiteres 1,3-Propandiol zu bilden. Die erreichbare c_{PD} sollte noch etwas darunter liegen, da an die PD-Bildung auch zwangsläufig die Bildung von Nebenprodukten geknüpft ist, die zusätzlich inhibieren.

6.3.2 Fermentation freier Zellen von AT1

Da in den Experimenten in Injektionsvials beispielsweise der pH-Wert durch die Pufferung nur bedingt im optimalen Bereich gehalten werden kann, wurde eine Kultivierung von AT1 in verschiedenen *batch*-Fermentationen durchgeführt. Im Fermenter können zudem einfach Nährstoffe oder Substrat nachgefüttert werden. Die rechnergestützte Datenerfassung mit *DASYlab*® (datalog, Mönchengladbach) erlaubt die ständige Kontrolle der Aktivität der Zellen.

Es wurden verschiedene Fermentationen durchgeführt, um Ergebnisse aus den Versuchen in Injektionsvials zu überprüfen und um die Leistungsfähigkeit von AT1 für die PD-Bildung unter Bedingungen näher am Optimum zu ermitteln.

Einfluss der Nährsalze

Die Beobachtung, dass höhere Konzentrationen der Nährsalze in TM2 die PD-Bildung von AT1 verbessern, konnte im Fermenter bestätigt werden.

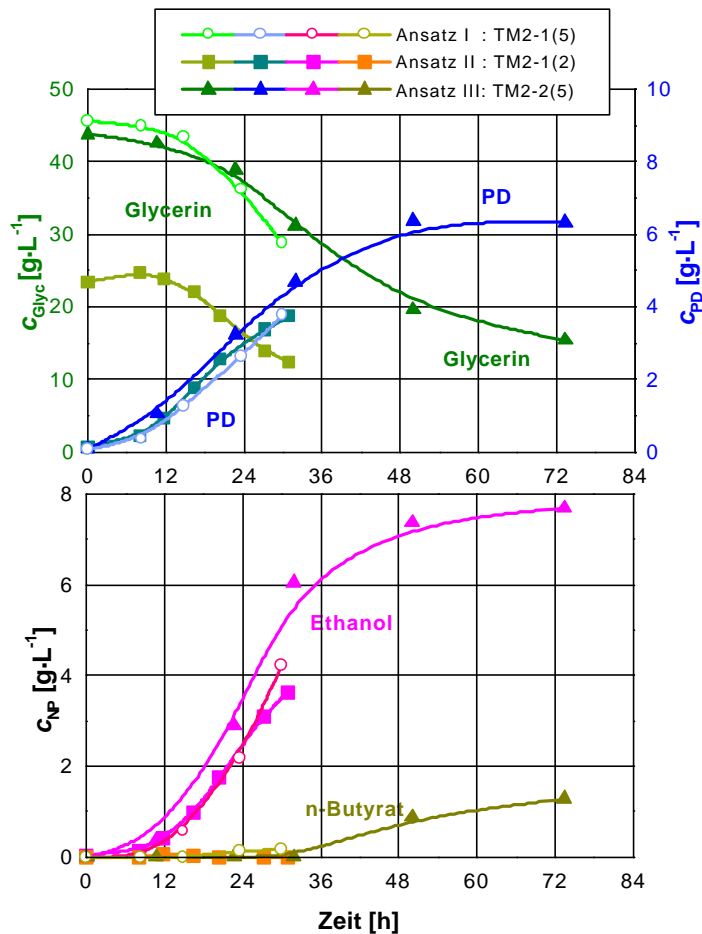


Abbildung 6-9: Vergleich dreier *batch*-Fermentationen mit AT1

Medium TM2 (Variationen TM2-1 und TM2-2), Reinglyceringehalt variiert, pH 6,0, $J = 60\text{ °C}$, $V_R = 300\text{ mL}$

In Abbildung 6-9 sind die Konzentrationsverläufe dreier Fermentationen gezeigt. In den Ansätzen I und II wurde TM2-1, also das TM2 mit *einfacher* Nährsalzkonzentration verwendet, in Ansatz III hingegen TM2-2, sprich das gleiche Medium mit *doppelter* Nährsalzkonzentration. Der Verlauf in den ersten 30 h zeigt vergleichbar mit den Versuchen in Vials einen geringen positiven Einfluss der höheren Nährsalzkonzentration auf die PD-Bildung (vgl. Abbildung 6-7). Wiederum setzt die PD-Bildung schneller ein. Der Vergleich der ersten 30 h der Ansätze I und III zeigt daneben eine deutliche Steigerung der molaren Ausbeute durch mehr Nährsalze. Die molaren Ausbeuten liegen bei 0,27 für Ansatz I (TM2-1) und 0,44 für Ansatz III (TM2-2). Diese Werte liegen damit deutlich höher als die Ausbeuten aus den entsprechenden Vial-Experimenten mit je 0,19. Wegen der besseren PD-Bildung und der höheren Ausbeute wurde im weiteren TM2-2 anstelle von TM2-1 verwendet.

Aufgrund experimenteller Schwierigkeiten wurden die Experimente mit TM2-1 schon nach etwa 30 h zu früh abgebrochen, sodass keine Aussage möglich ist, ob mit der niedrigeren Salzkonzentration eine gleich hohe PD-Konzentration erreicht werden kann wie mit TM2-2.

Begrenzung der PD-Bildung

Bei mehreren Fermentationen wurde mit etwa $6\text{ bis }7\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ die maximale PD-Konzentration erreicht. Als Ursachen kommen eine Limitierung von Nährstoffen sowie eine Inhibierung durch Metabolite im Kultivierungsmedium in Frage.

Um zu überprüfen, was den Abbruch der PD-Bildung bewirkt, wurde eine Fermentation von AT1 in TM2-2 durchgeführt, bei der bereits zu Beginn die Hälfte der üblicherweise zum Fermentationsende gebildeten Konzentration an PD ($3,0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), Ethanol ($3,8\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) und n-Butyrat

($0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im Fermenter vorgelegt wurde. Den Verlauf der Fermentation mit vorgelegten Produkten und einer üblichen Fermentation zeigt Abbildung 6-10.

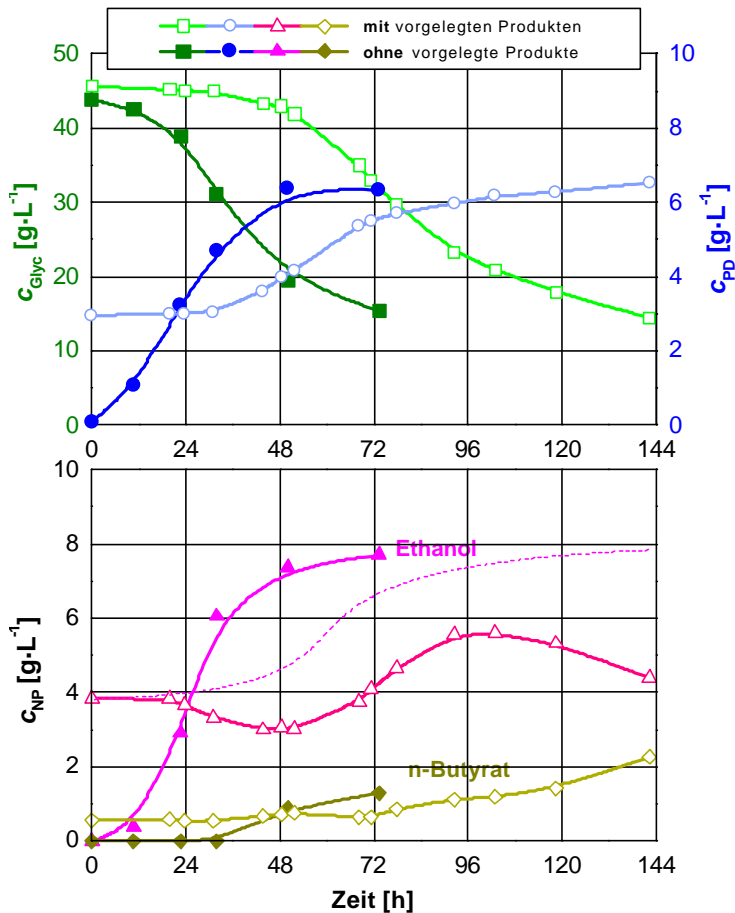


Abbildung 6-10: Vergleich zweier Fermentationen mit und ohne vorgelegte Produkte zur Überprüfung von Limitierung oder Inhibition. Die gestrichelte Linie im unteren Teil gibt den vermuteten Verlauf der Ethanolkonzentration *ohne* Austrag durch den Abgasstrom an.

Medium TM2-2 mit Reinglycerin, pH 6,0, $J = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_R = 300 \text{ mL}$

Das Vorhandensein der Produkte schon zu Beginn (offene Symbole) führt zu einer verlängerten *lag*-Phase von über einem Tag. Auch anschließend verläuft die PD-Bildung langsamer als üblich, und c_{PD} erreicht erst nach vier Tagen einen Wert von mehr als $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Tatsache, dass beide gezeigten Fermentationen bei fast gleicher PD-Konzentration praktisch zum Stillstand kommen, weist darauf hin, dass Produktinhibition und nicht Limitierung durch einen Nährstoff verantwortlich ist. Die Nährstoffe sollten nämlich für die Bildung von etwa $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PD, also insgesamt bis zu einer Konzentration von etwa $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ausreichen. Die Ursache für den hohen Glycerinverbrauch und die daher niedrige molare Ausbeute von 0,14 im Falle der schon vorgelegten Produkte ist unklar – insbesondere auch der Verbleib des Glycerins.

Bei der durchgeführten Fermentation mit vorgelegten Produkten wurde offenbar trotz des eingesetzten Dimroth-Kühlers (5 bis $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$) vorhandenes Ethanol mit dem (Ab)gasstrom aus dem Fermenter gestrippt. In der *lag*-Phase sinkt c_{EtOH} zunächst, steigt dann - niedriger als der Ethanolbildung entsprechend - an und geht in der praktisch stationären Phase der PD-Bildung wieder deutlich zurück. Die eingezeichnete gestrichelte Linie gibt den erwarteten Verlauf der Ethanolkonzentration ohne das Ausstrippen wieder. Die Fermentation macht damit deutlich, wie einfach es möglich ist, Ethanol während der Umsetzung aus dem Fermenter zu entfernen.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass bei keiner anderen Fermentation ein vergleichbarer Ausatrag an Ethanol beobachtet wurde. Eventuell war bei der vorliegenden Fermentation der Kühler nicht korrekt installiert.

Kultivierung unter unsterilen Bedingungen

Es wurden verschiedene Fermentationen mit freien Zellen von AT1 unter unsterilen Bedingungen durchgeführt, d.h. ohne vorheriges Autoklavieren des Fermenters oder des Kultivierungsmediums. Im Verlaufe dieser mehrtägigen Fermentation wurden keine Kontaminationen mit Fremdkeimen beobachtet. Offenbar stellt die anaerobe Kultivierung bei 60 °C und pH 6,0 in TM2 mit Glycerin zumindest für eine kurze Dauer recht selektive Bedingungen dar.

62

Nutzung von Rohglycerin

Abbildung 6-11 zeigt den Vergleich zweier Fermentationen mit Reinglycerin und dem Rohglycerin aus der Oelmühle Leer.

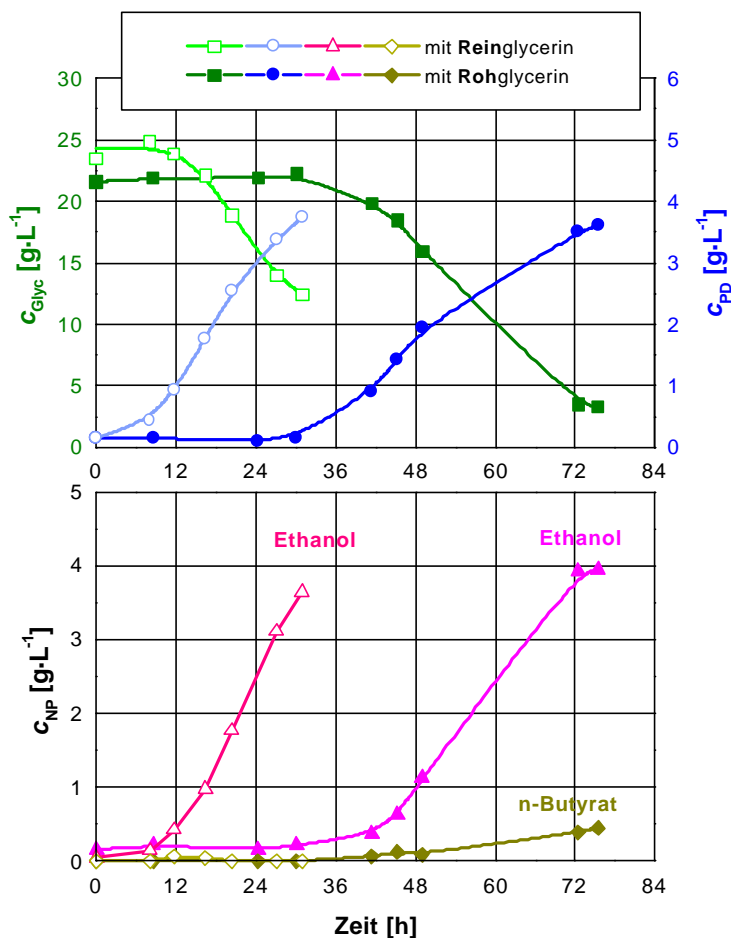


Abbildung 6-11: Vergleich der Nutzung von Rein- und Rohglycerin zur PD-Bildung mit AT1.

Medium TM2-2 mit Reinglycerin, pH 6,0, $J = 60$ °C, $V_R = 300$ mL

Es wird deutlich, dass das verwendete Rohglycerin zu einer verlängerten *lag*-Phase von mehr als einem Tag führt. Anschließend verläuft die Bildung von PD aus Rohglycerin etwas langsamer – die Produktivität liegt bei $0,11 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ anstelle von $0,15 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ für Reinglycerin. Auch Y_{PD} ist mit 0,22 für Rohglycerin deutlich geringer als mit 0,32 für Reinglycerin. Dennoch bestätigt das Experiment, dass AT1 in der Lage ist, auch verunreinigte Rohglycerine für die PD-Bildung zu verwenden. Leichte Einbußen bei der Umsetzung mit RG wurden auch mit dem mesophilen Stamm *C. butyricum* NRRL B-1024 zunächst beobachtet, konnten jedoch mittels Adaptation der Zellen durch konsequente Stammhaltung auf RG überwunden werden.

6.3.3 Untersuchungen mit immobilisierten Zellen von AT1

Als Immobilisierungsmatrix für die Experimente mit AT1 wurde Ca-Alginat gewählt. Für das Biopolymer ist keine toxische Wirkung auf die Zellen zu erwarten. Es existiert große Erfahrung bei der Herstellung von Alginatperlen, und der Herstellungsprozess lässt eine gute Kontrolle der Immobilisierungsbedingungen, z.B. der Temperatur oder der Sauerstoffeinwirkung, zu. Eine Nutzung von LentiKats® auf Basis von PVA ist nicht möglich, da deren Einsatz auf einen Temperaturbereich von bis zu etwa 55 °C beschränkt ist.

Einflüsse bei der Herstellung der Immobilisate von AT1

Um die Zellen von AT1 während der Immobilisierung optimal zu schonen, müssten sowohl anaerobe als auch thermophile Bedingungen bei allen Schritten des Alginateinschlusses gewährleistet sein. Da dies sowohl die Vorkultur, die Alginatlösung, die CaCl₂-Lösung als auch die umgebende Atmosphäre umfasst, lässt sich eine solche optimale Immobilisierung mit angemessenem Aufwand nicht realisieren. Die Bemühungen zielten daher in die Richtung herauszufinden, welche Anforderungen an die äußeren Bedingungen wichtig sind.

Analog der Herstellung der Kultivierungsmedien wurde für alle Experimente versucht, die Alginatlösung durch Autoklavieren weitgehend von Sauerstoff zu befreien.

Temperatur

Zunächst wurde versucht, mit möglichst geringem Aufwand, durch eine rasche Perlenherstellung in normaler aerober Atmosphäre mit der auf 60 °C temperierten Abblasapparatur eine hohe Überlebensrate der Zellen zu gewährleisten. Der Herstellungsprozess mit dem Einrühren der Zellen in die Alginatlösung, dem Vertropfen und Aushärten sowie dem Überführen in den Fermenter dauerte insgesamt nur etwa 20 Minuten.

Bei der nachfolgenden Kultivierung der Immobilisate im Fermenter wurde keine PD-Bildung festgestellt. Auch bei der mikroskopischen Betrachtung der Perlen nach Abbruch der Kultivierung konnte trotz hoher Anfangsbeladung von $1,4 \times 10^8$ Zellen je mL keine Koloniebildung beobachtet werden. Eine einfache, schnelle Immobilisierung von AT1 ließ sich also nicht realisieren.

Sauerstoffgehalt der CaCl₂-Lösung

Um die Bedingungen für ein Überleben von AT1 während des Geleinschlusses zu verbessern, wurde im nächsten Versuch zusätzlich zur Temperierung der Abblasapparatur der Sauerstoffgehalt der CaCl₂-Lösung durch N₂-Begasung herabgesetzt und zusätzlich durch Zugabe von $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Cystein das Redoxpotenzial weiter gesenkt. Die getroffenen Maßnahmen können den Sauerstoffzutritt nicht vollständig verhindern, sollten jedoch die Schädigung durch O₂ mildern. Wiederum nahm der Immobilisierungsprozess etwa 20 Minuten in Anspruch. Auch durch die so reduzierte Sauerstoffeinwirkung wurde die Überlebensrate nicht signifikant gesteigert. Trotz hoher Anfangsbeladung von $1,1 \times 10^8$ Zellen je mL wurde weder PD-Bildung mit den Immobilisaten noch Koloniebildung beobachtet.

Ausschluss der Sauerstoffs aus dem Herstellungsprozess

Um den Sauerstoff als Störfaktor bei der Immobilisierung auszuschließen, wurden Alginatperlen mit AT1 in der Anaerobierbank durch Abtropfen mit einer Spritze hergestellt. Anschließend wurden die Perlen nicht in den Fermenter sondern in ein 50-mL-Injektionsvial überführt, um auch einen für diesen Schritt möglichen Sauerstoffzutritt zu verhindern. Aufgrund damit verbundener erheblicher experimenteller Schwierigkeiten musste für die Herstellung in der AB auf eine Temperierung der Alginatlösung sowie der CaCl₂-Lösung verzichtet werden.

Die Alginatperlen mit AT1 wurden in TM2-1 bei 60 °C inkubiert. Nach vier Tagen wurden Perlen aus dem stark getrübten Ansatz entnommen und unter der Stereolupe betrachtet. Abbildung 6-12 zeigt ein Foto der Perlen mit den gebildeten Kolonien von AT1.

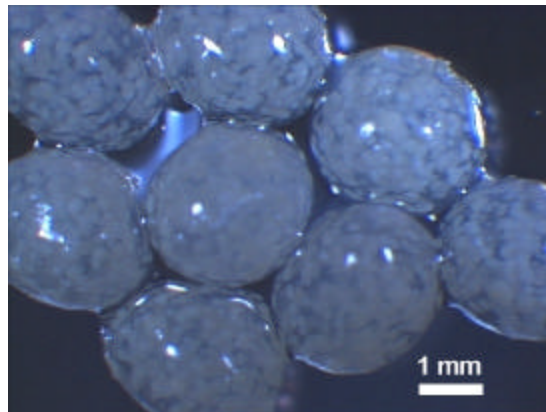


Abbildung 6-12: Stereomikroskopische Aufnahme von Alginatperlen mit AT1. Deutlich ist die Koloniebildung im Inneren der Immobilisate nach vier Tagen der Inkubation in TM2-1 bei 60 °C zu erkennen.

Nach der gezeigten Aufnahme kann die Zahl der Kolonien je Perle auf etwa 800 bis 1000 abgeschätzt werden.

Die in der AB mit Spritze hergestellten Alginatperlen haben einen verhältnismäßig großen Durchmesser von etwa 2,0 bis 2,5 mm. In den Perlen haben sich relativ wenige, jedoch große Kolonien mit einem Durchmesser von 200 bis 300 µm gebildet - teilweise sind die Kolonien schon zusammengewachsen. Auf Basis der in Abbildung 6-12 gezeigten Perlen und der Menge der eingesetzten Biomasse kann die Überlebensrate abgeschätzt werden. Die Biomasseanfangsbeladung der Alginatlösung lag bei $6,6 \times 10^7$ Zellen je mL. Aus der Abbildung lässt sich die Koloniezahl je Perle mit etwa 800 bis 1000 abschätzen. Bei einem Perlenvolumen von etwa 0,006 mL ergeben sich etwa 135.000 bis 170.000 Kolonien je mL Gelvolumen und eine Überlebensrate von lediglich etwa 0,2 %. Diese niedrige ÜR deutet darauf hin, dass auch die durchgeführte Immobilisierung in der AB noch keine optimalen Bedingungen für AT1 bietet.

Fermentation immobilisierter Zellen von AT1

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der in Ca-Alginatperlen immobilisierten Zellen von AT1 wurden 10,2 g der Perlen im 500-mL-Rührreaktor bei Werten für V_R zwischen 100 und 310 mL untersucht. Durch Variation des Reaktionsvolumens konnten unterschiedliche Werte für c_{IB} eingestellt werden. Wie bei freien Zellen wurde die PD-Bildung sowohl in TM2-1 als auch in dem Medium mit höherem Nährstoffgehalt (TM2-2) untersucht. Der Fermenter wurde wegen der nur geringen Stabilität von Alginatperlen nur schwach gerührt. Um dennoch starke pH-Sprünge aufgrund einer schlechten Regelung zu vermeiden, wurde mit 2 M NaOH titriert.

Es wurde eine Reihe von Fermentationen durchgeführt. In Abbildung 6-13 ist die Entwicklung der Glycerin- und Produktkonzentrationen in der zeitlichen Abfolge der durchgeführten *batch*-Fermentationen dargestellt. Die Abfolge ist zweimal durch eine „Kühlphase“ (K) mit nur 48 °C zur Haltung der Immobilisate bei niedriger Aktivität unterbrochen.

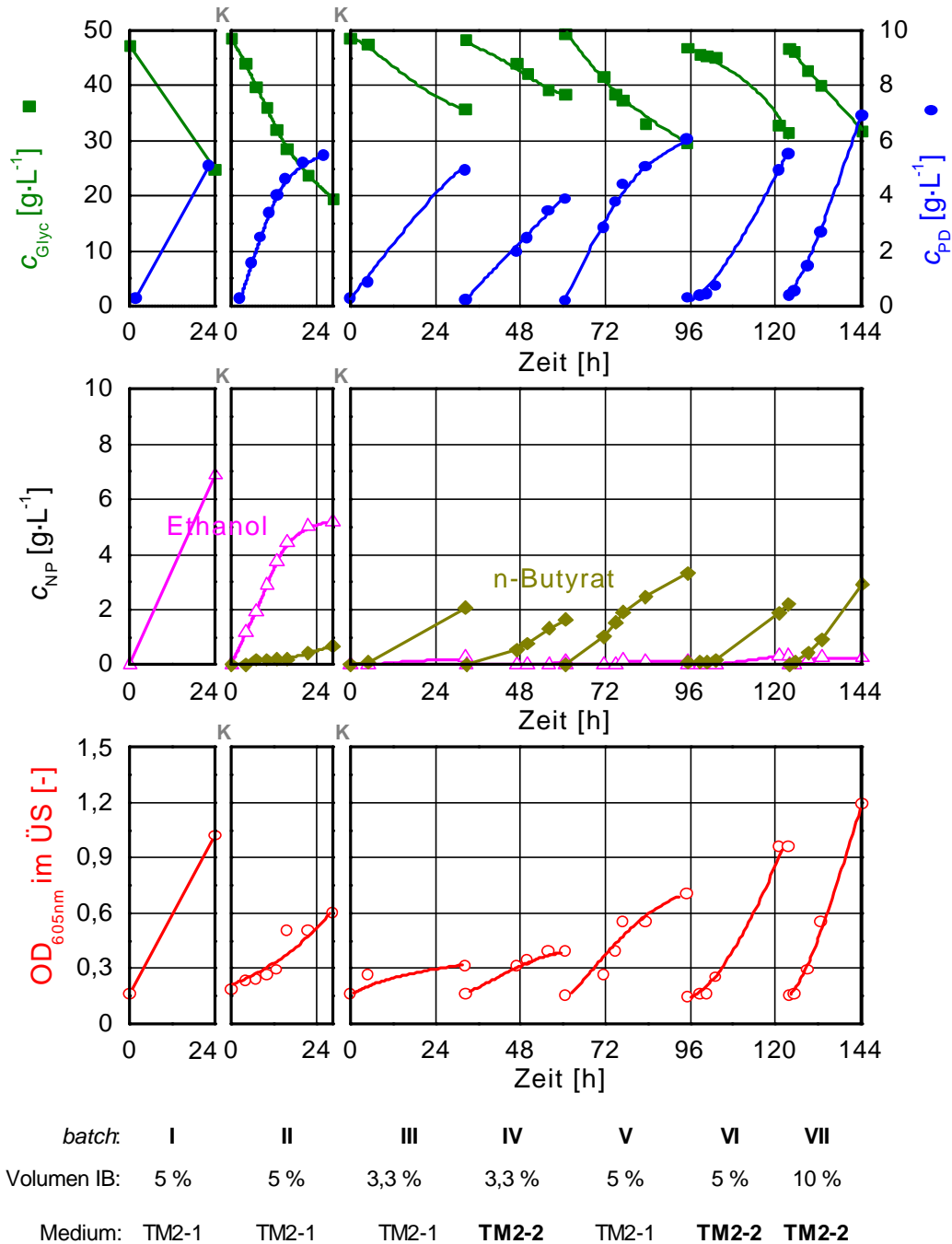


Abbildung 6-13: Verläufe der Substrat- und Produktkonzentrationen in den *batch*-Fermentationen mit immobilisierten Zellen von AT1. **K**: Kühlphase mit $J=48\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die molaren Ausbeuten gibt Tabelle 6-3

Kultivierungsbedingungen: Medium TM2, pH 5,7, $J=58\text{ }^{\circ}\text{C}$, V_R variiert

Produktivität

Nach der ersten Kühlphase wurde die Umsetzung zum ersten Mal gezielt verfolgt (**II**). Bei einem Immobilisatanteil von 5 % (w/v) konnte unter Verwendung von TM2-1 innerhalb der ersten 10 h eine maximale PD-Produktivität von $0,31\text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ ermittelt werden. Im Anschluss an eine weitere Kühlphase wurde der Immobilisatanteil auf 3,3 % (w/v) gesenkt. Sowohl bei Verwendung von gewöhnlichem TM2-1 als auch von nährstoffreicherem TM2-2 zeigte AT1 eine maximale

Produktivität von etwa $0,15 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ (III,IV). Offensichtlich kann die PD-Bildung durch das Mehrangebot an Nährstoffen nicht beschleunigt werden. Gleiches zeigte sich auch in den beiden folgenden *batch*-Fermentationen (V,VI) mit einem Immobilisatanteil von 5 % (w/v). Unabhängig von der Salzkonzentration des Mediums wurde in beiden Fällen eine Produktivität von etwa $0,25 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ erzielt.

Die Erhöhung des Immobilisatgehaltes von 3,3 % (w/v) auf 5 % (w/v) entspricht somit in etwa der Steigerung der Produktivität. Dies bedeutet, dass die Umsetzung bis zu einem Immobilisatanteil von 5 % (w/v) noch nicht durch die Erschöpfung einer Medienkomponente limitiert wird. Die stabile PD-Produktivität zeigt, dass das Wachstum von AT1 in den Alginateperlen praktisch abgeschlossen ist.

Durch weitere Verringerung des Reaktionsvolumens wurde der Immobilisatanteil auf 10 % (w/v) weiter erhöht und die Produktbildung in TM2-2 verfolgt (VII). Trotz des doppelten Immobilisatanteils wurde mit $0,36 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ nur eine Steigerung um den Faktor 1,4 im Vergleich zu den Ansätzen mit 5 % (w/v) Immobilisatgehalt (V,VI) erreicht. Eine Ursache hierfür ist die Limitierung durch Medienbestandteile, d.h. die gleiche absolute Immobilisatmenge kann im geringeren Medienvolumen nicht in gleichem Maße mit Nährstoffen versorgt werden.

Abbildung 6-13 zeigt, dass durch die bislang durchgeführte Immobilisierung von AT1 die Produktivität verglichen mit freien Zellen nur etwa verdoppelt werden konnte. Zum einen liegt das an der noch nicht optimalen Versorgung der immobilisierten Biomasse im Fermenter. Nicht einmal bei einem Immobilisatanteil von 10 % (w/v) konnten die Zellen optimal versorgt werden. Ein wichtiger Punkt sind jedoch auch die Immobilisate selbst. Weder Größe noch Kolonieverteilung der Alginateperlen sind optimal. Die sehr großen Perlen führen zu einer schlechten Nutzung des zentralen Perlenvolumens. Für aerobe Mikroorganismen wird eine äußere Schicht von nur etwa 150 μm als unlimitiert und von 200 bis 300 μm als limitiert nutzbar angesehen (CHANG und MOO-YOUNG 1988, KUROSAWA und TANAKA 1990, WIJFFELS *et al.* 1996). Auch bei anaeroben MO dürfte nur eine – wenngleich auch dickere – äußere Hülle eines Immobilisatpartikels maßgeblich an der Umsetzung beteiligt sein. Für Perlen mit einem Durchmesser von 2,5 mm bedeutet dies, dass etwa die Hälfte des Gelvolumens schlecht oder gar nicht genutzt wird. Die geringe Überlebensrate führt dazu, dass sich wenige, dafür jedoch meist große Kolonien bilden. Da die Zellen weiter im Inneren einer Kolonien aufgrund schlechter Versorgung wenig zur Umsetzung beitragen, wird die in den untersuchten Perlen vorhandene Biomasse ebenfalls nicht optimal genutzt. Durch eine hohe ÜR und viele kleine Kolonien würde eine weitaus größere Gesamtoberfläche der Kolonien die spezifische Aktivität der Immobilisate steigern.

Erst durch die Herstellung kleinerer Perlen mit Durchmesser von 1 mm und darunter und das Erreichen einer deutlich höheren ÜR für AT1 lässt sich das volle Potenzial der Immobilisierung für die PD-Produktivität ausschöpfen.

Produktspektrum

In den ersten beiden *batch*-Fermentationen (I,II) werden ähnlich wie bei der Fermentation freier Zellen hauptsächlich Ethanol und nur wenig n-Butyrat als Nebenprodukt gebildet. Dahingegen wird ab dem dritten *batch* hauptsächlich n-Butyrat gebildet und praktisch kein Ethanol mehr. Beim Betrachten dieses Wechsels muss berücksichtigt werden, dass die zweite „Kühlphase“ immerhin etwa zwei Tage dauerte. Die Temperatur von 48 °C diente lediglich der vorübergehenden Verlangsamung der Aktivität, erlaubte vermutlich jedoch eine Weiterentwicklung der Biomasse in den Immobilisaten (vgl. Abbildung 6-4).

Ein ähnlicher Wechsel in den gebildeten Nebenprodukten wurde bei einer vergleichbaren Abfolge von *batch*-Fermentationen mit freien Zellen von AT1 nicht beobachtet. Jedoch unterschei-

det sich die Kultivierung der freien von der mit immobilisierten Zellen grundsätzlich dadurch, dass bei immobilisierten Zellen die Biomasse sich in Form von Kolonien ständig weiterentwickelt und dadurch verändern kann. Beispielsweise kann sich durch das fortgesetzte Wachstum der Kolonien die Substratversorgung der immobilisierten Zellen ändern. Denkbar ist auch physiologischer Stress der Zellen durch das zunehmend geringere Raumangebot in den Gelperlen. Die Zellen gehen also möglicherweise im Verlauf der *batch*-Fermentationen von einem „freien“ zu einen mehr „immobilisierten“ Stoffwechsel über. Ein ähnliches Phänomen wurde bei der Kultivierung von kryogelierten PVA-Perlen mit *K. pneumoniae* S6 beobachtet. Hier wechselte das Nebenproduktspektrum von Ethanol in Richtung Acetat (WITTLICH 1996). Das Auftreten eines kontaminierenden MO im Verlauf der zweiten Kühlphase kann weitgehend ausgeschlossen werden, da es sich bei AT1 um eine Reinkultur handelt und die Zellen in den Ca-Alginat-Gelperlen vor einem überwachsen durch fremde Mikroorganismen weitgehend geschützt sind.

Der Wechsel von Ethanol zu n-Butyrat als vorwiegendes Nebenprodukt wirkt sich positiv auf die PD-Ausbeuten aus (Tabelle 6-3).

Tabelle 6-3: Molare Ausbeuten für PD und Nebenprodukte bei der *batch*-Fermentation von Alginatperlen mit AT1. Die Nummern der *batch*-Fermentationen beziehen sich auf Abbildung 6-13.

<i>Batch</i> -Fermentation	II	III	IV	V	VI	VII
verbrauchtes Glycerin [g · L ⁻¹]	28,94	12,87	9,88	19,77	15,40	15,06
gebildetes PD [g · L ⁻¹]	5,18	4,66	3,65	5,85	5,21	6,49
Y_{PD} [mol · mol ⁻¹]	0,22	0,44	0,45	0,36	0,41	0,52
Y_{EtOH} [mol · mol ⁻¹]	0,36	0,04	0,03	0,02	0,04	0,03
Y_{But} [mol · mol ⁻¹]	0,03	0,17	0,17	0,18	0,14	0,20
$(Y_{PD} + Y_{EtOH} + 2 \cdot Y_{But})$ [mol · mol ⁻¹]	0,64	0,82	0,82	0,74	0,73	0,95

Die Tabelle zeigt, dass tendenziell die PD-Ausbeute mit der Bildung von n-Butyrat als Nebenprodukt deutlich steigt. Bei der letzten *batch*-Fermentation mit einem Immobilisatanteil von 10 % (w/v) wird sogar eine molare PD-Ausbeute von mehr als 0,50 erreicht. Die Ursache für die stärkere PD-Bildung liegt im Gleichgewicht der Reduktionsäquivalente bei der Vergärung von Glycerin begründet. Wird verstärkt das oxidierte n-Butyrat anstelle des reduzierten Ethanol gebildet, stehen mehr Reduktionsäquivalente für die Bildung von PD zu Verfügung.

In der letzten Zeile von Tabelle 6-3 ist die Summe der molaren Ausbeuten der einzelnen *batch*-Fermentationen aufgeführt. Y_{But} wird doppelt gerechnet, da für die Bildung von n-Butyrat (C4-Körper) im Stoffwechsel zwei C3-Körper (Glycerin) benötigt werden. Die Werte zeigen, dass in keinem Fall die Summe der molaren Ausbeuten bei 1,00 liegt. Eine Ursache hierfür ist, dass ein Teil des Glycerins z.B. für den Aufbau von Biomasse verwendet wird. Denkbar ist auch die Bildung weiterer Nebenprodukte, die in der HPLC-Analytik nicht erfasst werden konnten. Daneben ist auch ein Austrag von Ethanol aus dem Fermenter nicht gänzlich auszuschließen.

Der Verlauf der OD in Abbildung 6-13 verdeutlicht die geringe Stabilität der Alginatperlen. In der ersten und zweiten *batch*-Fermentation steigt die OD verhältnismäßig rasch an. Eventuell ist dies auf das schnelle Zerfallen von weniger stabilen Perlen zurückzuführen. In den *batches* III und IV ist der Anstieg nur gering. Anschließend verläuft der Anstieg der OD jedoch immer schneller. Die Ursache hierfür liegt im zunehmenden Auflockern und Zerfallen der sehr dicht besiedelten Alginatperlen. Die nach Beenden des letzten *batches* aus dem Fermenter entnommenen Perlen hatten eine mürbe, aufgeweichte Struktur.

Insgesamt verläuft die Entwicklung der OD in den gezeigten Ansätzen relativ zur PD-Bildung deutlich langsamer als bei der Kultivierung freier Zellen. Bis zur Bildung von etwa $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PD wurde dort eine OD von etwa 3,0 bis 3,5 erreicht. Dies zeigt, dass hauptsächlich die immobilisierte Biomasse für die PD-Bildung verantwortlich ist.

7 Ergebnisse und Diskussion – PD-Bildung mit *Clostridium butyricum*

Am Institut für Technologie der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) wird seit 1994 an der Entwicklung eines biotechnischen Verfahrens zur Produktion von 1,3-Propanediol aus Glycerin mit immobilisierten Zellen gearbeitet. Aus einem umfangreichen Screening gingen verschiedene Stämme als potenzielle PD-Produzenten hervor. In erster Linie sind hier die Stämme *K. pneumoniae* S6 und *C. butyricum* NRRL B-1024 zu nennen (LUTZ 1999, SCHLIEKER 1999, WITTLICH 1996). Grundlegende Eigenschaften der beiden Stämme zeigt folgende Aufstellung:

<i>Clostridium butyricum</i> NRRL B1024	<i>Klebsiella pneumoniae</i> S6
empfindlich gegenüber Sauerstoff, d.h. schwierige Handhabung niedrigste Risikoklasse (L1)	unempfindlich gegenüber Sauerstoff, d.h. robuster Organismus potenziell pathogen (L2)
Ausbeute ~0,5 kg PD je kg Glycerin	Ausbeute ~0,4 kg PD je kg Glycerin

Wegen der Unempfindlichkeit gegenüber Sauerstoff erfolgten die meisten grundlegenden Untersuchungen mit *Klebsiella pneumoniae*, obwohl dieser Organismus aufgrund seines erhöhten Infektionspotenzials (Risikogruppe 2) für die technische Anwendung im großen Maßstab weniger geeignet sein dürfte. Eine Reihe von Charakterisierungen, die für eine Prozessoptimierung wichtig sind, erfolgte mit *K. pneumoniae* (LUTZ 1999, WITTLICH 1996).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Nutzung des sauerstoffempfindlichen jedoch mikrobiologisch weniger risikoreichen Bakteriums *C. butyricum* NRRL B-1024 für die biotechnische PD-Bildung.

7.1 Charakterisierung suspendierter Zellen

Parallel zur Entwicklung einer geeigneten Immobilisierungstechnik für *C. butyricum* NRRL B-1024 und zur Untersuchung der Immobilisate erfolgte die Charakterisierung der PD-Bildung durch den Clostridienstamm in freier Form.

7.1.1 Einfluss der Substratkonzentration

In Schüttelkolbenexperimenten wurde die Substratinhibierung suspendierter Zellen von *C. butyricum* gegenüber Glycerin untersucht. Dabei wurden Glycerinkonzentrationen von 10 bis 150 g·L⁻¹ gewählt, also ein Bereich, der für den Einsatz von Rohglycerinwässern, die direkt aus Fett verarbeitenden Anlagen stammen, interessant ist. Für das Experiment wurde Rohglycerin aus der Biodieselherstellung (Oelmühle Connemann, Leer) verwendet.

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten am Institut war eine Kultivierung von *C. butyricum* NRRL B-1024 auf diesem Substrat bei größeren Konzentrationen von mehr als 50 g·L⁻¹ nicht möglich. Durch konsequente Stammhaltung auf Rohglycerin bei steigenden Konzentrationen adaptierte sich der Stamm immer besser an das Substrat. Nach zunächst beobachtetem Wachstum mit starker Flockenbildung waren die Clostridien später ohne erkennbare Unterschiede auf Rein- oder Rohglycerin kultivierbar.

Den Einfluss der Glycerinkonzentration auf die PD-Bildung von *C. butyricum* zeigt Abbildung 7-1.

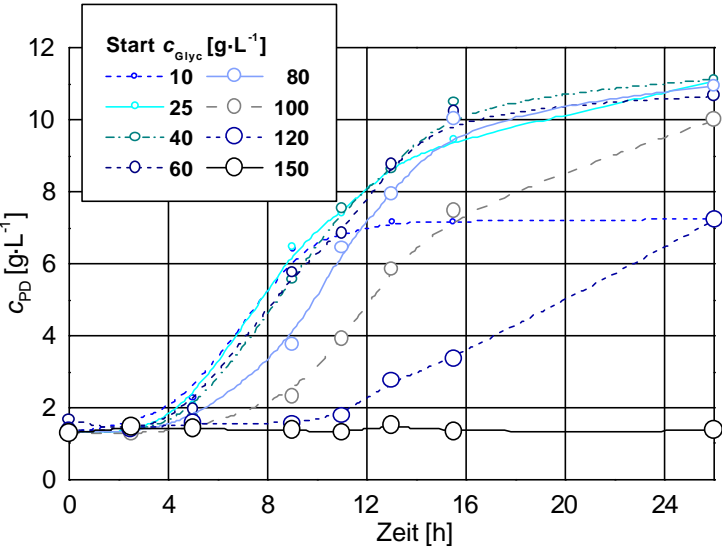


Abbildung 7-1: Einfluss der Glycerinkonzentration auf die PD-Bildung von *C. butyricum* NRRL B-1024

Medium: MinS⁶⁶N¹⁰RG, pH 7,5, *J* = 35 °C, *V_R* = 50 mL

Abbildung 7-1 zeigt, dass die PD-Bildung umso schneller verläuft, je niedriger die Glycerinkonzentration ist. In einem Bereich bis etwa 80 g·L⁻¹ Glycerin ist der Einfluss dabei nur gering. Ab 100 g·L⁻¹ ist jedoch eine deutliche Aktivitätseinbuße zu erkennen. Bei 150 g·L⁻¹ war im gezeigten Experiment keine PD-Bildung mehr nachzuweisen. Beim Betrachten der Ergebnisse muss bedacht werden, dass neben dem Substrat Glycerin auch die Produkte, insbesondere 1,3-Propandiol inhibierend wirken. So wird eine Glycerinkonzentration von 50 g·L⁻¹ keinesfalls problemlos toleriert werden, wenn bereits 50 g·L⁻¹ PD vorliegen.

Die Bereiche maximaler Steigung der PD-Bildung aus den verschiedenen Ansätzen wurden zur Ermittlung der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeit, sprich PD-Produktivität, herangezogen. Das Ergebnis zeigt Tabelle 7-1.

Tabelle 7-1: Abhängigkeit der PD-Produktivität von *C. butyricum* NRRL B-1024 von der Glycerinkonzentration. Die Werte wurden durch lineare Regression der in Abbildung 7-1 gezeigten Daten ermittelt.

Start c_{Glyc} [g·L ⁻¹]	10	25	40	60	80	100	120	150
$P_{\text{PD,max}}$ [g·(L·h) ⁻¹]	1,22	1,11	0,96	0,79	0,94	0,81	0,36	0,00
Zeitbereich [h]	5 - 9	5 - 9	5 - 11	5 - 16	9 - 16	9 - 16	11 - 26	16 - 26

Aus den vorliegenden Daten kann durch Auftragung nach LINEWEAVER und BURKE kein *k_S*-Wert für Glycerin ermittelt werden. Die maximale PD-Produktivität liegt im Bereich von 1,4 g·(L·h)⁻¹. Setzt man den *k_S*-Wert für Glycerin mit 0,3 g·L⁻¹ an (vgl. 7.1.5) ergeben sich nach MONOD und HALDANE die in Abbildung 7-2 angegebenen Verläufe.

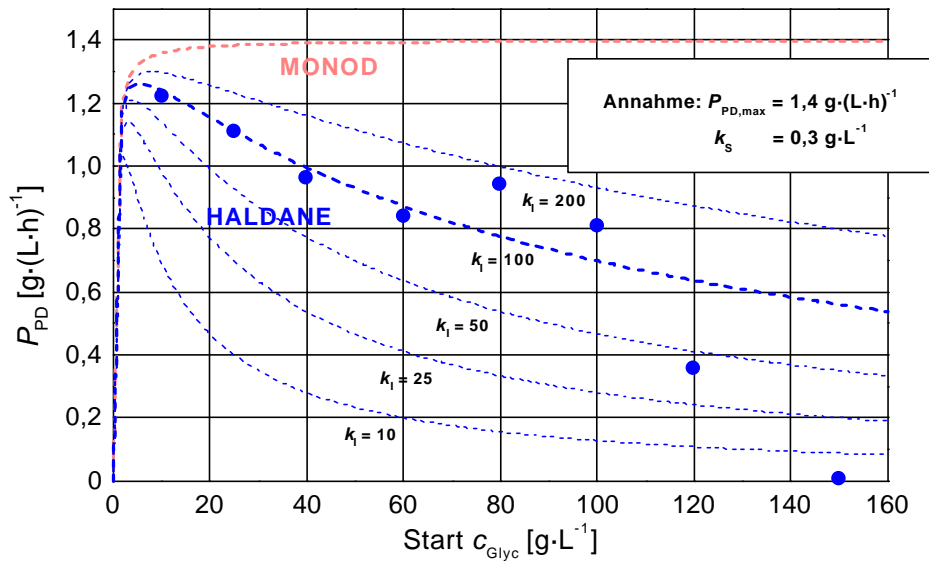


Abbildung 7-2: Abhängigkeit der PD-Produktivität von der Glycerinkonzentration. Die gestrichelten Kurven zeigen theoretische Verläufe nach HALDANE sowie MONOD ($k_i \rightarrow \infty$):

$$P_{PD} = P_{PD,max} \frac{c_{Gly}}{k_s + c_{Gly} \left(1 + \left(\frac{c_{Gly}}{k_i} \right) \right)}$$

Die Punkte zeigen die Messdaten aus dem in Abbildung 7-1 gezeigten Experiment.

Die Hemmkonstante für Glycerin liegt nach obiger Darstellung im Bereich von $k_i = 100$. Die Versuche zeigen, dass für eine maximale Produktivität stets eine möglichst geringe Glycerinkonzentration in der Kultur vorliegen sollte. Hierfür bietet sich ein kontinuierlich betriebener Rührkessel (CSTR) als Reaktor an. Sollte für das Erreichen einer ausreichend hohen Produktkonzentration der *batch*-Betrieb vorteilhaft sein, ist das kontinuierliche Zudosieren von Glycerin parallel zur Umsetzung ratsam (*fed-batch*-Betrieb).

Für die Untersuchung immobilisierter Zellen muss der optimale Bereich der Glycerinkonzentration neu ermittelt werden, da hier durch Transportphänomene eine deutlich höhere Mindestkonzentration für maximale Produktivität nötig sein kann.

7.1.2 Nutzung von Rohglycerin

Da für den angestrebten Prozess die Verwendung von Rohglycerin außer Frage steht, wurde die Stammhaltung und Kultivierung von *C. butyricum* bereits früh auf die Verwendung von Rohglycerin umgestellt. Nach einer kurzen Adaptierungsphase der Clostridien innerhalb der Stammhaltung, die sich in abnehmender Neigung zur Flockenbildung während der Kultivierung äußerte, konnten die Zellen auch bei Glycerinkonzentrationen im Bereich von über $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ kultiviert werden. Alle Experimente mit *C. butyricum* wurden in der Folgezeit mit Rohglycerin aus der RME-Anlage in Leer (RG Leer) durchgeführt, falls nicht anders erwähnt.

Nach der Adaptierung an RG wurde für verschiedene Rohglycerine deren Nutzung für die PD-Herstellung mit freien Zellen von *C. butyricum* untersucht und mit Pharmaglycerin (PG) verglichen (vgl. 4.2.5). Das Ergebnis zeigt Tabelle 7-2.

Tabelle 7-2: Produktbildung bei anaerobem Wachstum freier Zellen von *C. butyricum* auf verschiedenen Glycerinsorten nach 22 h im Schüttelkolben

Glycerinsorte:	PG Leer	RG Leer	RG Bruck	RG Kassel
Start c_{Glyc} [g·L ⁻¹]	30,5	28,0	31,3	19,9
daraus gebildet nach 22 h				
c_{PD} [g·L ⁻¹] (Y_{PD} [-])	10,5 (0,47)	10,4 (0,51)	11,0 (0,52)	k.W.
c_{But} [g·L ⁻¹] (Y_{But} [-])	2,7 (0,10)	2,7 (0,11)	2,6 (0,11)	k.W.
c_{Ac} [g·L ⁻¹] (Y_{Ac} [-])	1,1 (0,06)	0,9 (0,06)	1,8 (0,11)	k.W.

Man erkennt, dass die beiden Rohglycerine aus den RME-Anlagen in Leer und Bruck ähnliche Ergebnisse liefern wie das verwendete Pharmaglycerin. Hingegen wird das stark verunreinigte RG aus der Altfettmethylester (AME)-Pilotanlage der Gesamthochschule Kassel nicht verwertet. Eventuell wäre hier eine Vorreinigung vonnöten.

7.1.3 Inhibierung durch Hemmstoffe aus Rohglycerin

Bei den im Laufe der Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass auch innerhalb der RG aus einer Anlage deutliche Unterschiede bezüglich der mikrobiellen Nutzung bestehen. Bei einer verwendeten Charge des RG aus Leer war eine dünne ölreiche Schicht aufgelagert. Der Einsatz dieses Rohglycerins führte zu Flockenbildung im Medium nach dem Autoklavieren und zu einem verminderten Wachstum von freien Zellen von *C. butyricum*. In LentiKats® immobilisierte Zellen zeigten eine geringere Überlebensrate (vgl. 7.7.1).

Um die Ursache für die inhibierende Wirkung der aufgelagerten Ölschicht zu finden, wurde aus der *selben Probe* des betroffenen Rohglycerins die ölige Substanz angereichert und gleichzeitig möglichst ölarmses RG entnommen. Die beiden resultierenden Proben wurden am Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der FAL mit ICP-MS analysiert. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 7-3.

Tabelle 7-3: Vergleich der Konzentrationen verschiedener Metallionen aus der ölarmsen und der ölreichen Phase einer RG-Charge aus der RME-Anlage der Oelmühle Connemann in Leer. Alle Angaben in ppm (mg je kg).

Element	Rohglycerin aus Leer		Faktor (ölreich / ölarms)
	ölige Phase	ölarms Phase	
Al	7,6	0,7	11 ×
Ca	165	71	2 ×
Cd	0,007	0,004	2 ×
Cr	0,77	0,13	6 ×
Cu	25,9	1,7	15 ×
Fe	16,6	3,1	5 ×
Ni	2,6	2,8	1 ×
Mg	32,6	12,7	3 ×
Mn	0,50	0,13	4 ×
Mo	0,6	0,2	3 ×
Pb	0,06	0,01	6 ×
Zn	4,0	0,4	10 ×

Es zeigt sich, dass abgesehen von Ni alle untersuchten Metallionen, insbesondere Cu, Zn und Al aber auch Cr und Pb in der Ölschicht angereichert vorliegen. Dies ist möglicherweise auf

sogenannte Schwermetalllignine zurückzuführen, die von anderen Arbeitsgruppen für RG aus der Biodieselproduktion beschrieben sind (PAPANIKOLAOU *et al.* 2000).

7.1.4 Produktinhibierung

Die erreichbare Produktkonzentration spielt eine wichtige Rolle für den Prozess. Es wurde daher untersucht, wie sich eine steigende PD-Konzentration auf die Aktivität von *C. butyricum* auswirkt. Für die Untersuchung wurde dem Standardmedium MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵ vor dem Beimpfen PD in Konzentrationen bis 75 g·L⁻¹ zugesetzt. Abbildung 7-3 zeigt den Einfluss der vorgelegten c_{PD} auf die PD-Produktivität.

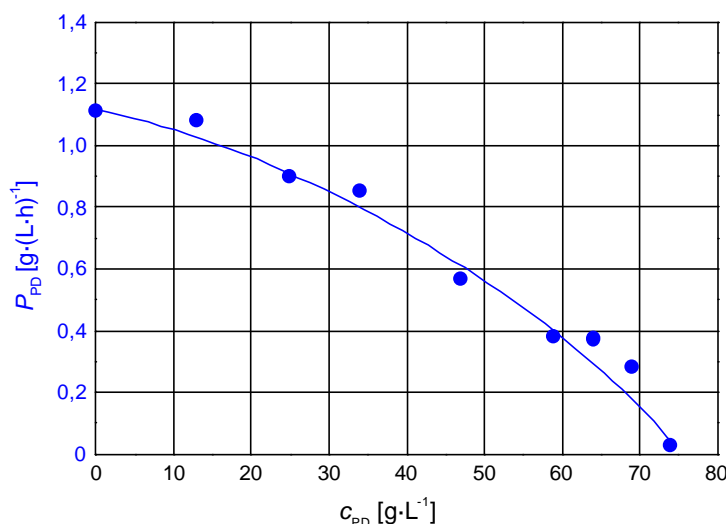


Abbildung 7-3: Einfluss der im Medium zu Beginn vorgelegten PD-Konzentration auf die PD-Bildung von *C. butyricum*.

Medium: MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵, pH 7,5,
 $J = 35\text{ °C}$, $V_R = 50\text{ mL}$

Deutlich ist die inhibierende Wirkung von PD zu erkennen. Dabei ist kaum eine Grenzkonzentration zu erkennen, bis zu der PD ohne Aktivitätseinbuße toleriert würde. Vielmehr wird eine fast gleichmäßiges Absinken der Produktivität beobachtet. Bei vorgelegten 75 g·L⁻¹ PD war eine nur sehr geringe weitere PD-Bildung feststellbar. Die maximal bestimmte c_{PD} lag bei 76,5 g·L⁻¹.

Die genannten Konzentrationen dürfen jedoch nicht mit der in einer Umsetzung maximal erreichbaren PD-Konzentration gleichgesetzt werden. Hier spielen die parallel vorliegende Glycerinkonzentration, vor allem aber die unvermeidlich stattfindende Nebenproduktbildung eine große Rolle (vgl. 7.1.5).

7.1.5 Leistungsfähigkeit von *C. butyricum* NRRL B-1024

Um die Leistungsfähigkeit des PD bildenden Clostridienstammes zu prüfen, wurde er in suspendierter Form in einer *fed-batch*-Fermentation kultiviert. Abbildung 7-4 zeigt den Verlauf der Fermentation.

Nach den ersten 48 h wird eine c_{PD} von etwa 52 g·L⁻¹ erreicht. Es ergibt sich eine P_{PD} von 1,1 g·(L·h)⁻¹. Die maximal erreichte PD-Konzentration beträgt 58,4 g/L. Aus der gezeigten Fermentation kann man die spezifische PD-Bildung von *C. butyricum* NRRL B-1024 mit etwa 1 g PD je g BTM und h errechnen.

PETITDEMANGE *et al.*, die ebenfalls mit Rohglycerin aus einer RME-Anlage arbeiteten, erreichten in *fed-batch*-Fermentationen mit einem selbstisolierten Clostridienstamm vergleichbare Ergebnisse. Die Produktivitäten lagen zwischen 1,0 und 1,4 g·(L·h)⁻¹. Die nach 48 h erzielten Konzentrationen betrugen zwischen 50,3 und 65,6 g·L⁻¹ (PETITDEMANGE *et al.* 1995).

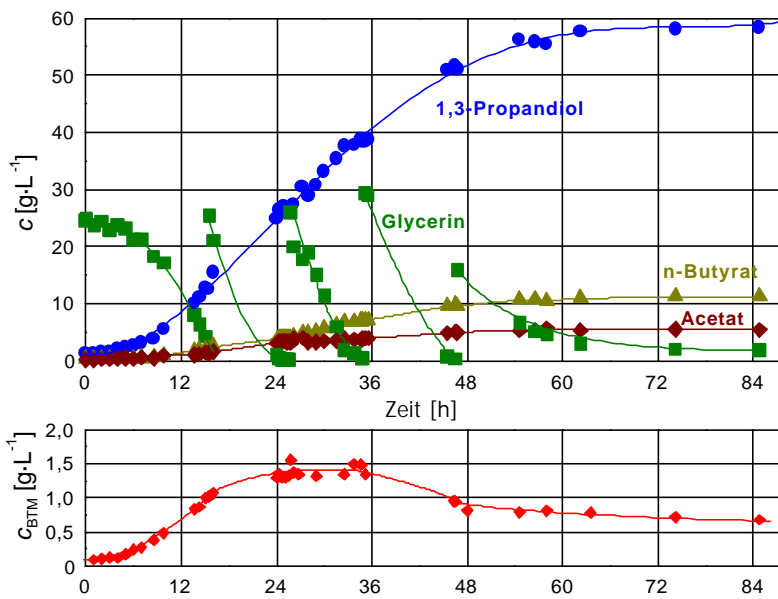


Abbildung 7-4: Fermentation mit suspendierten Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024.

Medium: MinS⁶⁶N¹⁰RG, pH 7,0, $J = 35^\circ\text{C}$, $V_R = 2500\text{ mL}$, Inokulum 10 % (v/v)

Auch der Vergleich mit anderen Glycerinfermentationen mit Clostridien zeigt, dass der in dieser Arbeit verwendete Stamm *C. butyricum* NRRL B-1024 einen leistungsfähigen Produktionsstamm darstellen kann.

Zur Bestimmung des k_S -Wertes von *C. butyricum* NRRL B-1024 für Glycerin wurden die Zellen am Ende des ersten Tages, also vor dem zweiten Zufüttern, ausgehungert. Abbildung 7-5 zeigt für den entsprechenden Zeitraum neben dem Verlauf von c_{Glyc} auch den Laugeverbrauch, der als Maß für die Zellaktivität herangezogen wird (vgl. 7.8).

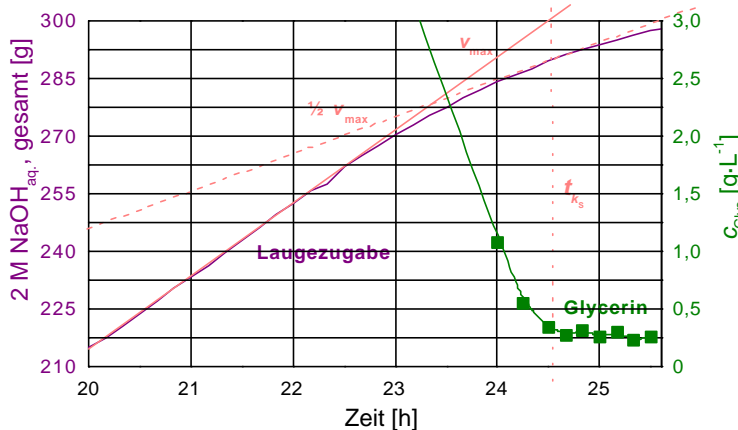


Abbildung 7-5: Detailausschnitt der in Abbildung 7-4 gezeigten Fermentation zur Ermittlung des k_S -Wertes für Glycerin von *C. butyricum* NRRL B-1024.

Deutlich ist zu erkennen, dass die maximale Laugezugabe bis zu kleinen c_{Glyc} von etwa $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ beibehalten bleibt. Anschließend sinkt die Zellaktivität deutlich innerhalb kurzer Zeit. Die halbmaximale Laugezugabe wird erst bei einem k_S -Wert von etwa $0,3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glycerin erreicht. Dieser Wert liegt deutlich oberhalb des Wertes, der von ZENG *et al.* für *C. butyricum* DSM 5431 angegeben wird (ZENG *et al.* 1994). Eine geringere Enzymaffinität oder ein verminderter Zufluss von Glycerin in *C. butyricum* NRRL B-1024 können die Ursache sein.

Abbildung 7-4 zeigt, dass nach dem Aushungern bei erneutem Zufüttern von Glycerin die Aktivität der Zellen schnell wieder ihre vorherige Höhe erreicht. Der in Abbildung 7-5 gezeigte Rück-

gang der Zellaktivität ist also Folge des Aushungerns und nicht der steigenden Produktkonzentration. c_{PD} liegt nach 24,5 h erst bei $26,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

7.1.6 Wachstum auf Kohlenhydraten als zusätzlicher C-Quelle

In Schüttelkolbenexperimenten wurde die Nutzung von Glucose und Saccharose für die PD-Bildung mit *C. butyricum* NRRL B-1024 untersucht. Es wurden sowohl die beiden Zucker als alleinige C-Quelle (G0 und S0, s.u.) als auch jeweils in verschiedenen Mengenverhältnissen mit Glycerin als Co-Substrat eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen die Tabellen 7-4.

Tabellen 7-4: Produktbildung in den Experimenten zur Verwertung von Glucose und Saccharose als Co-Substrat zur PD-Bildung aus Glycerin mit *C. butyricum*. Medium: MinS⁶⁶N¹⁰PG, pH 7,5, $J = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_R = 50 \text{ mL}$. Die Daten des Vergleichsansatzes *ohne* Zugabe von Kohlenhydratquelle (-Glc) wurde dem Experiment zum Einfluss der Glycerinkonzentration auf die PD-Bildung von *C. butyricum* entnommen (vgl. 7.1.1). Für diesen Ansatz beträgt die Dauer 6,5 h anstelle von 6 h.

Glucose-Ansatz:	-Glc	G0	G1	G2	G3	G4
Start c_{Glyc} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	9,71	0	9,62	9,16	4,78	1,24
Start c_{Glc} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0	8,17	0,37	0,80	4,07	4,15
gebildete Produkte und Substratkonzentrationen nach 6 h:						
c_{PD} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	4,85	0	4,17	4,44	2,52	0,92
$Y_{PD / \text{Glyc}}$ [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,67	-	0,69	0,72	0,94	0,98
$Y'_{PD / \text{Glyc}}$ [$\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$]	0,55	-	0,57	0,59	0,78	0,81
$Y'_{PD / \text{Glc}}$ [$\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$]	-	-	11,27	5,55	0,62	0,22
m_{Glc} / m_{PD} [$\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$]	-	-	0,09	0,18	1,62	4,51
Rest c_{Glyc} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,91	0	2,33	1,68	1,55	0,10
Rest c_{Glc} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0	5,34	0	0	0	0
c_{But} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,51	0,39	0,65	0,63	0,70	0,77
c_{Ac} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,69	0,18	0,25	0,35	0,56	0,38
c_{EtOH} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0	0,22	0	0	0,15	0,19

Saccharose-Ansatz:	S0	S2	S3
Start c_{Glyc} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0	9,48	4,66
Start c_{Sacch} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	7,42	0,93	4,02
gebildete Produkte und Substratkonzentrationen nach 6 h:			
c_{PD} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0	3,61	2,28
$Y_{PD / \text{Glyc}}$ [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	-	0,72	0,94
$Y'_{PD / \text{Glyc}}$ [$\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$]	-	0,59	0,78
$Y'_{PD / \text{Sacch}}$ [$\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$]	-	3,88	0,56
$m_{\text{Sacch}} / m_{PD}$ [$\text{kg} \cdot \text{kg}^{-1}$]	-	0,26	1,76
Rest c_{Glyc} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0	3,38	1,74
Rest c_{Sacch} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	1,13	0	0
c_{But} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,99	0,39	0,61
c_{Ac} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,30	0,44	0,63
c_{EtOH} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,17	0	0,05

Weder Glucose noch Saccharose werden als alleinige C-Quelle von *C. butyricum* NRRL B-1024 zu PD umgesetzt. Die Tabellen machen jedoch deutlich, dass die beiden Kohlenhydrate offenbar als Co-Substrat verwertet werden und so eine stärkere Umsetzung von Glycerin zu PD ermöglichen. Die Wirkung auf die PD-Ausbeute, sprich die je umgesetzter Glycerinmenge gebildete PD-Menge, ist dabei stark vom Verhältnis, in dem Zucker und Glycerin eingesetzt werden (Z/G), abhängig. Den Einfluss von Z/G zeigt Abbildung 7-6.

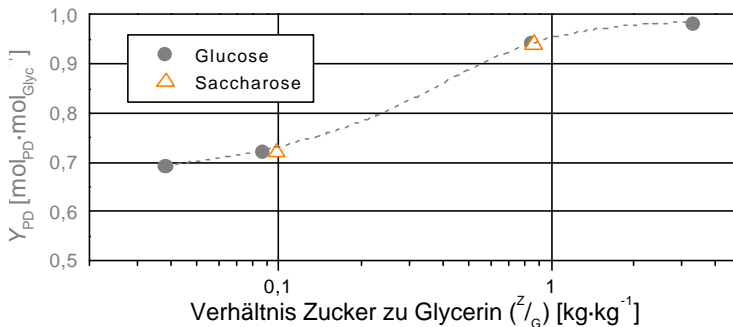


Abbildung 7-6: Einfluss des Verhältnisses von Zucker zu Glycerin Z/G im Kultivierungsmedium auf die molare PD-Ausbeute bezogen auf Glycerin für *C. butyricum* NRRL B-1024.

Medium: MinS⁶⁶N¹⁰PG, pH 7,5, $J = 30$ °C, $V_R = 50$ mL

Je größer die je Glycerin eingesetzte Menge an Zucker, desto mehr PD wird aus dem Glycerin gebildet. Dies wird unabhängig von der Art des Zuckers, Glucose oder Saccharose, beobachtet. Nach dem Prinzip der *Diauxie* kann man erwarten, dass die C-Quellen nacheinander verwertet werden. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass Glycerin und Glucose bzw. Saccharose *parallel* verwertet werden (Abbildung 7-7).

Die gezeigten Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von SCHÜTZ und RADLER mit verschiedenen Stämmen von *Lactobacillus* (SCHÜTZ und RADLER 1984). Bei Lactobacillen wird Glucose in die Glykolyse eingeschleust und parallel dazu Glycerin zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten über 3-HPA zu PD umgesetzt. Für ruhende Zellen von *Citrobacter freundii* und *Klebsiella pneumoniae* DSM 4270 berichten TRAN-DINH und HILL von einer verbesserten PD-Ausbeute, wenn Glycerin und Glucose gleichzeitig vorhanden sind (TRAN-DINH und HILL 1989). Eine simultane Fermentation dieser beiden Substrate zur PD-Bildung mit einem gentechnisch veränderten Stamm von *E. coli* beschreiben auch TONG und CAMERON 1992. SAINT-AMANS und SOUCAILLE finden für *C. butyricum* eine parallele Nutzung von Glycerin und Glucose in Experimenten im Chemostaten (SAINT-AMANS und SOUCAILLE 1995). BIEBL und MARTEN konnten für *C. butyricum* DSM 5431, jedoch nicht für einen Stamm von *Citrobacter* eine Nutzung von Glucose als Co-Substrat und eine deutlich erhöhte PD-Ausbeute zeigen. Mit dem Clostridium konnten so 90 % des Glycerins zu PD umgesetzt (BIEBL und MARTEN 1995).

Die gezeigte *indirekte* Nutzung von Kohlenhydraten für die PD-Herstellung ist unter zweierlei Aspekten wichtig: Zum einen sind Kohlenhydrate im Vergleich zu Glycerin sehr kostengünstig und in großen Mengen verfügbar. „Wertvolles“ Glycerin wird also praktisch vollständig zu PD umgesetzt. Zum anderen sollte durch das Zugabe von Kohlenhydraten zu verdünnten Glycerinchargen (Rohglycerinwässern) auch mit diesen Substraten eine ausreichend hohe PD-Konzentration zu erreichen sein. Mit Glycerin als einziger C-Quelle bildet *C. butyricum* NRRL B-1024 maximal etwa 0,5 g PD je 1 g Glycerin. Dies bedeutet, dass sich mit Rohglycerinwasser mit 10 % (w/v) Glycerin lediglich etwa 50 g · L⁻¹ PD erzielen lassen. Höhere PD-Konzentration mit diesem Substrat sind nur möglich, wenn entweder konzentrierteres Glycerin zugefüttert wird oder eben Kohlenhydrate als Co-Substrat eingesetzt werden.

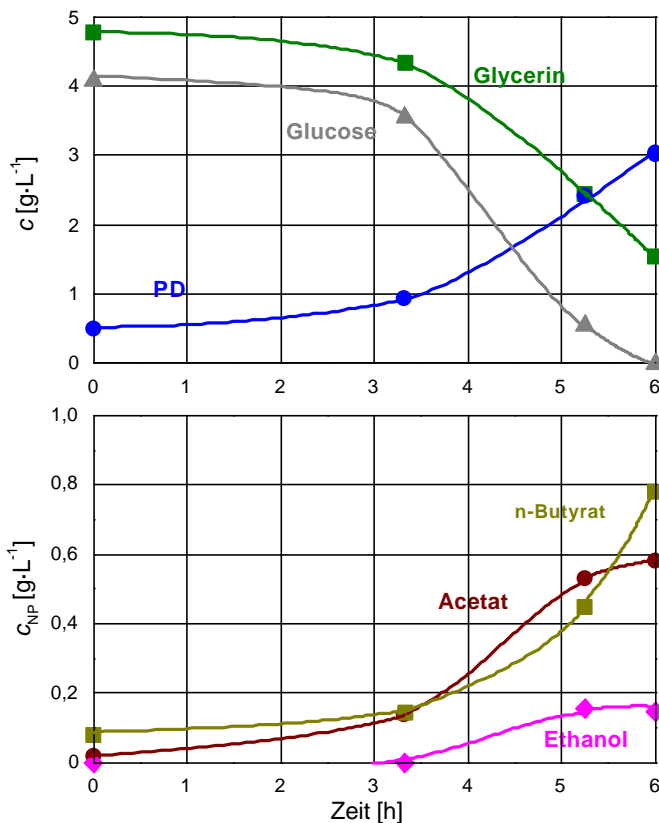


Abbildung 7-7: Parallele Nutzung von Glycerin und Glucose durch *C. butyricum* NRRL B-1024. Die Abbildung zeigt den Verlauf aus Ansatz G3 (s.o.).

Medium: MinS⁶⁶N¹⁰PG, pH 7,5,
 $J = 30^\circ\text{C}$, $V_R = 50\text{ mL}$

7.2 Immobilisierung der Sporen von *C. butyricum* NRRL B-1024

Zur Immobilisierung wurden der PD-Bildner zunächst in Hydrogelkugeln auf Basis von PVA nach der sogenannten *freezing-thawing*-Methode eingeschlossen (LOZINSKY 1986). Die beiden Spezies von *K. pneumoniae* und *C. butyricum* zeigten sehr unterschiedliche Toleranz gegenüber dieser Art der Immobilisierung. Während *K. pneumoniae* den Einschluss problemlos meisterte, konnte für *C. butyricum* eine nur sehr geringe Überlebensrate in einem Bereich von 0,01 bis 0,1 % abgeschätzt werden (WITTLICH 1996). Diese geringe Überlebensrate kann auf die Sauerstoffsensitivität der Clostridien zurückgeführt werden. Bedingt durch Erfordernisse der gewählten Immobilisierung in PVA-Perlen sind die frisch immobilisierten Zellen über einen Zeitraum von 20 bis 30 h dem Luftsauerstoff ausgesetzt. Dessen Einfluss wird dadurch verschärft, dass die Herstellung der PVA-Perlen durch Eintropfen in auf etwa -20°C gekühltes Silikonöl erfolgt. Neben der Schädigung durch das Einfrieren wirkt das Silikonöl durch die gute O_2 -Löslichkeit wie ein Schwamm für den umgebenden Sauerstoff.

Es muss befürchtet werden, dass nur die vollständig ausgebildeten Sporen der Clostridien die Prozedur einer Immobilisierung in PVA-Perlen überstehen. Daraus ergibt sich zwangsläufig die Strategie, möglichst viele Sporen in der zu immobilisierenden Kultur zu haben. Eine Quantifizierung der Sporen, die die spätere Behandlung überstehen werden, ist im Vorfeld schwierig. Zwar lassen sich die Sporen gut unter dem Lichtmikroskop auszählen, jedoch ist damit nicht geklärt, ob diese Sporen tatsächlich fertig ausgeprägt und damit resistent sind. Auch eine Zählung, z.B. durch Ausplattieren, nach Hitzebehandlung (Pasteurisieren) liefert nur den Anteil der *hitzebeständigen* Sporen, erlaubt also ebenso wenig einen Rückschluss auf die Verträglichkeit gegenüber Einfrieren und Sauerstoff.

Für den Erhalt einer Vorkultur mit besserer Toleranz gegenüber der Immobilisierungsprozedur, sprich mit höherer Überlebensrate, wurden daher Versuche unternommen, den Anteil der Sporen in den Kulturen von *C. butyricum* NRRL B-1024 zu erhöhen. Die Quantifizierung der Sporen erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

7.2.1 Steigerung der Sporenmenge

Um den Anteil von Sporen an der zu immobilisierenden Biomasse zu erhöhen, wurde vor allem auf die Entwicklung eines geeigneten Mediums für die Vorkultivierung der Biomasse gesetzt. Diese Strategie ist in einer Reihe von Arbeiten erwähnt, die sich mit der Förderung der Sporulation bei *Clostridium acetobutylicum* (LONG *et al.* 1984) oder auch mit der Immobilisierung von Clostridien sporen durch Geleinschluss beschäftigen (FÖRBERG *et al.* 1983, HÄGGSTRÖM 1981, HÄGGSTRÖM und MOLIN 1980, HÄGGSTRÖM und ENFORS 1982, REARDON und BAILEY 1988). Daneben wurden auch andere Einflüsse untersucht, beispielsweise der pH-Wert.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 7-5 zusammengefasst. Alle Untersuchungen wurden unter Sauerstoffausschluss durchgeführt.

Tabelle 7-5: Ergebnisse der Untersuchungen zur Förderung der Sporulationshäufigkeit von *C. butyricum* NRRL B-1024

Ansatz	Medium	Versuchs- bedin- gungen	Zell- konzentration [10 ⁸ je mL]	Sporen- konzentration [10 ⁸ je mL]	Sporen- anteil [%]
Anaerobiervials					
(Glasvials mit Butylgummiseptum, V _R 100 mL, meist nicht pH-kontrolliert)					
1	MinS ⁶⁶ N ¹⁰ PG ⁵⁰	37 °C	5,2 (69 h)	0,56	11
2	RCM		6,1 (69 h)	1,60	26
3	Milch		3,8 (26 h)	0,91	24 *)
4	Milch + MinS ⁶⁶ N ¹⁰		(kein Wachstum)		
5	Milch + MinS ⁶⁶ N ¹⁰ PG ⁵⁰		5,8 (94 h)	0,88	15
6	Medium nach HÄGGSTRÖM und MOLIN, mit 40 g Stärke je Liter	30 °C 500 mL **)	2,0 (94 h)	0,42	21
7	mit 40 g Stärke je Liter		5,3 (96 h)	1,76	33
8	mit 10 g Stärke je Liter		1,6 (72 h) 4,7 (140 h)	0,61 0,24	38 5
Fermentation, pH-kontrolliert					
(Glasreaktor, V _R 100 mL, pH-Kontrolle mit NaOH _{aq.})					
9	Medium nach HÄGGSTRÖM und MOLIN, mit 20 g Glucosesirup je Liter ^{3*)}	37 °C	10,9 (25 h)	0,59	5
10	mit 50 g Glucosesirup je Liter	30 °C	17,3 (19 h)	0,92	5
11	wie Ansatz 10, jedoch NH ₄ ⁺ doppelt		18,8 (12 h)	0,24	1

*) unsicher, da eine Verwechslung mit Fetttropfchen möglich ist

**) pH-Wert täglich wieder auf etwa 7,0 eingestellt

3*) ersetzt die wasserlösliche Stärke

Die Tabelle zeigt, dass mit den untersuchten Methoden zur Förderung der Sporenbildung teilweise deutlich höhere Sporenanteile erzielt werden konnten, als dies bei dem standardmäßig für die Anzucht verwendeten Mineralsalzmedium der Fall war. Insbesondere bei Nutzung von stärkehaltigem Medium (Ansätze 7 und 8) sowie dem komplexen RCM (Ansatz 2) wurde ein ho-

her Sporenanteil verzeichnet. Zudem ist die absolut erreichte Zahl der Sporen in diesen Ansätzen meist hoch.

Die Nutzung von wasserlöslicher Stärke schneidet im Vergleich mit dem Glucosesirup günstiger ab. Hier bestätigt sich die Annahme, dass weniger gut verwertbare Kohlenstoffquellen die Sporenbildung fördern (vgl. 3.1.3). Ein Einfluss der Inkubationstemperatur konnte bei den durchgeführten Ansätzen nicht festgestellt werden. Eine Erhöhung der Ammoniumkonzentration scheint die Sporenbildung dagegen negativ zu beeinflussen.

7.2.2 Überprüfung der Eignung von erzeugten Clostridiensporen

Vor weiterführenden Versuchen sollte zunächst überprüft werden, inwieweit sich Sporen, die in den kohlenhydrathaltigen Medien erzeugt wurden, die für die Verkapselung in PVA-Perlen erwünschte Resistenz zeigen und sich für die anschließende anaerobe Umsetzung von Glycerin eignen. Für diese Untersuchung wurde eine RCM-Kultur von *C. butyricum* NRRL B-1024 verwendet, da die Clostridien auf diesem Medium eine gute Sporenbildung zeigen und die Quantifizierung der Sporen nicht durch etwaige Trübstoffe behindert wird.

Eine über mehrere Tage bewachsene Kultur mit etwa $2,2 \times 10^8$ Zellen je mL und einem pH-Wert von 5,0 wurde verwendet. Diese Kultur zeigt bei direkter mikroskopischer Betrachtung einen sehr hohen Anteil an fertig ausgebildeten Sporen. Eine Quantifizierung war zunächst durch vorhandene Biomasseflocken unmöglich. Die Biomasse wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, in PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in etwas PBS aufgenommen. Die so entstandene Zellsuspension hatte eine Gesamtzellkonzentration von $13,0 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$, die Sporenkonzentration betrug $4,3 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ (33 %). Diese Suspension wurde mit 20 % (v/v) für die Herstellung der PVA-Perlen eingesetzt. Die zellbeladene Polymerlösung wurde in $-23,5^\circ\text{C}$ kaltes Silikonöl Typ AK10 (Wacker, München) eingetropfelt und über einen Zeitraum von 24 h aufgetaut. Ein Teil der Perlen wurde anschließend in Mineralsalzmedium mit Glycerin, ein anderer Teil in RCM kultiviert. Auf $\text{MinS}^{66}\text{N}^{10}\text{PG}^{25}$ konnte weder Koloniewachstum noch PD-Bildung festgestellt werden. Nach Kultivierung in RCM wurden einige wenige große Kolonien im Gel beobachtet. Ihre Zahl wurde nicht bestimmt, war jedoch erheblich geringer als nach der Zahl der immobilisierten Sporen zu erwarten war. Dies bedeutet, dass nur wenige der unter dem Mikroskop eindeutig als Spore erkennbaren MO die Immobilisierung in PVA-Perlen überlebt haben. Nach mehrfachem Medienwechsel und sukzessivem Übergang von RCM zu $\text{MinS}^{66}\text{N}^{10}\text{PG}^{25}$ konnte jedoch keine PD-Bildung durch die immobilisierten Zellen festgestellt werden. Möglicherweise haben die auf RCM gebildeten und gekeimten Sporen ihre Fähigkeit zur Bildung von 1,3-Propandiol aus Glycerin verloren. Das gleiche Phänomen wurde für LentiKats[®] mit *C. butyricum* beobachtet. Auch hier konnte nach Immobilisierung von Sporen, die auf RCM erzeugt wurden, später keine PD-Bildung beobachtet werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Versuche zur Immobilisierung von Clostridiensporen eingestellt und stattdessen nach einer für die Clostridien schonenderen Art der Immobilisierung gesucht. Die Nutzung eines synthetischen Polymers als Gelmatrix ist wegen der damit verbundenen Möglichkeit zur unsterilen Kultivierung wichtig für ein rentables Verfahren. Daher wurde die neu entwickelte Methode des Geleinschlusses in LentiKats[®] erstmals für PD produzierende Bakterien eingesetzt. Diese parallel zur vorliegenden Arbeit am Institut für Technologie für die Einschlussimmobilisierung von Nitrifizierern entwickelte Immobilisierungsmethode nutzt PVA als Polymer und erlaubt die Bildung sehr stabiler Hydrogele (BLÜMEL 1998).

7.3 Immobilisierung in LentiKats®

Der Einschluss in LentiKats® erfolgt bei Raumtemperatur. Gleichzeitig ist die Dauer des Gelierungsvorganges gegenüber der Kryogelierung deutlich verkürzt, was die Sauerstoffexposition der Clostridien erheblich herabsetzt. Während bei der Kryogelierung die Einschlussimmobilisate über etwa zwei Tage in kaltem Siliconöl gelieren, vergeht beim Einschluss in LentiKats® etwa 1 h von der Ernte der Zellen aus der aktiven Kultur bis zur erneuten anaeroben Kultivierung der eingeschlossenen Biomasse. Gleichzeitig wird der Stress durch die tiefen Temperaturen der Kryogelierung vermieden.

Bei ersten Versuchen mit LentiKats® und *C. butyricum* wurde untersucht, ob die kurze Immobilisierungsdauer einen Einschluss der Zellen bei aeroben Verhältnissen erlaubt. Mit dem gleichen Inokulum wurden parallel aerob und anaerob LentiKats® mit *C. butyricum* hergestellt. Die Biomasseanfangsbeladung betrug $6,2 \times 10^7$ Zellen je mL. Die Herstellung der Immobilisate mit Auf-tropfen und Trocknen dauerte etwa 50 bis 60 Minuten. Direkt anschließend wurden die LentiKats® anaerob in der Anaerobierbank in MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵ bei 30 °C mit $c_B \sim 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ inkubiert. Der ÜS wurde nach 33 und 47 h gegen frisches Medium ausgetauscht. Den Verlauf der Inkubation von 33 bis 47 h nach der Herstellung zeigt Abbildung 7-8.

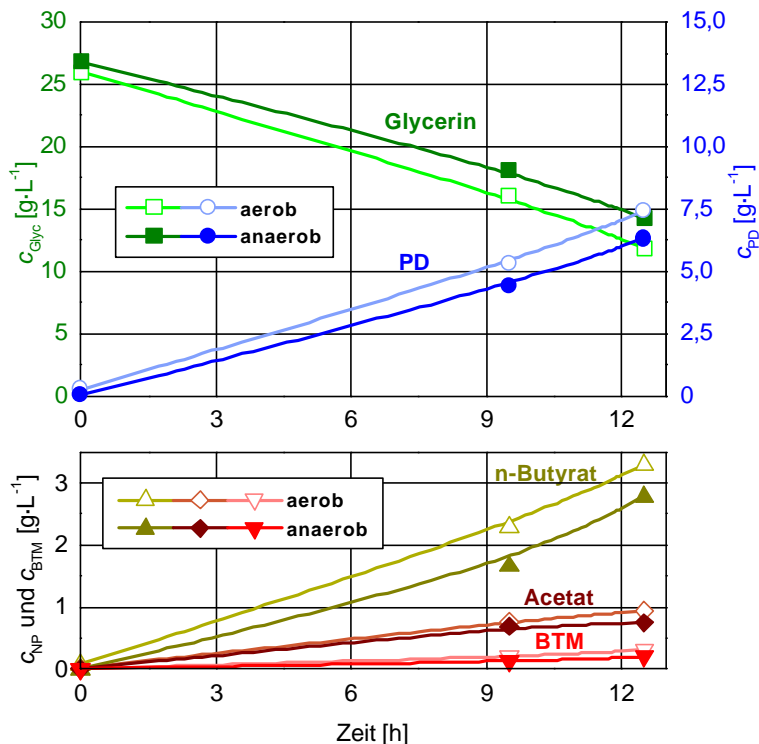


Abbildung 7-8: Ergebnisse der parallelen Inkubation von aerob und anaerob hergestellten LentiKats® mit *C. butyricum*. Gezeigt ist die zweite Inkubation. Es ist noch kein *steady state* erreicht.

Medium: MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵,
Start pH 7,5, $J = 30 \text{ °C}$,
 $c_B \sim 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Die Abbildung zeigt, dass sich die aerob und anaerob hergestellten Immobilisate praktisch gleich verhielten. Bei der stereomikroskopischen Untersuchung können wegen der dichten Besiedlung keine Unterschiede festgestellt werden. Aufgrund der sehr hohen Biomasseanfangsbeladung könnte auch bei einer Überlebensrate von „nur“ 30 oder 50 % wegen der Ausbildung eines Schalenkatalysators keine Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen festgestellt werden. Eine *Quantifizierung* der Schädigung durch den Luftsauerstoff lässt das Experiment also *nicht* zu. Das Experiment zeigt jedoch, dass sich *C. butyricum* im Gegensatz zu kryogelierten PVA-Perlen auch unter aeroben Bedingungen in LentiKats® immobilisieren lässt. Eine Immobilisat-Gel-Linse aus dem anaeroben Ansatz wurde für die Herstellung von Dünnschnitten für die mikroskopische Untersuchung herangezogen (vgl. 5.2).

7.4 Anzucht der Biomasse

Um für die verschiedenen folgenden Experimente zur Immobilisierung von *C. butyricum* NRRL B-1024 immer eine möglichst vergleichbare Biomasse zur Verfügung zu haben, wurde versucht, eine weitgehend reproduzierbare Vorkultivierung durchzuführen. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Zellen vorzugsweise immer der gleichen Wachstumsphase entnommen werden können (vgl. 4.6). Das Inokulum wurde aus einer aktiven Wachstumsphase entnommen. Die Zellen sollten hier eine hohe NADH_2 -Bildungsrate aufweisen, die Voraussetzung dafür ist, eintretenden Sauerstoff zu reduzieren und damit zu entgiften (MORRIS und O'BRIEN 1971). Abbildung 7-9 zeigt exemplarisch für zwei Ansätze, inwieweit die Vorkultivierung durch das gewählte Verfahren reproduzierbar durchführbar war.

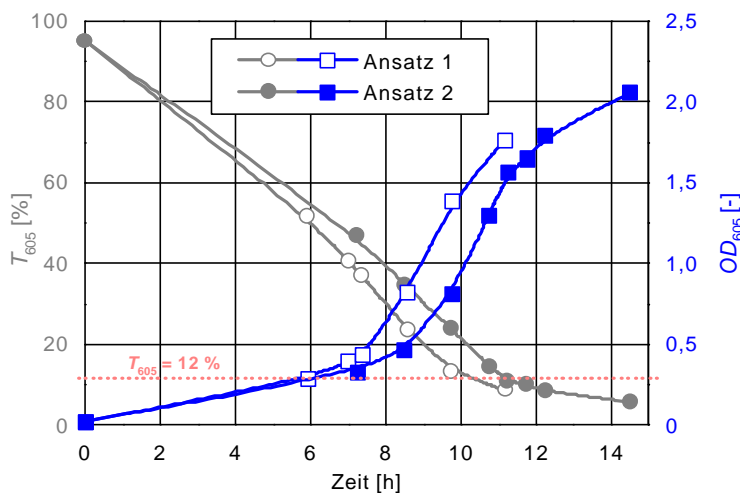


Abbildung 7-9: Vergleich zweier Ansätze einer Vorkultivierung von *C. butyricum* für die Immobilisierung in LentiKats®. Die graue gestrichelte Linie markiert die Transmission von 12 %, die für die Entnahme der Zellen aus der Vorkultur etwa gewählt wurde. Die Kultur befindet sich zu diesem Zeitpunkt in der späten exponentiellen Wachstumsphase.

Medium: $\text{MinS}^{66}\text{N}^{10}\text{RG}^{25}$,
Start pH 7,5, $J = 35^\circ\text{C}$

Die Abbildung zeigt, dass sich die Vorkultur zum Zeitpunkt der Zellentnahme bei einer unverdünnt gemessenen Transmission von 12 % jeweils in der späten exponentiellen Wachstumsphase befindet. Die OD_{605} beträgt bei dieser Transmission etwa 1,5 und die Zellzahl $5,0 \times 10^8$ Zellen je mL.

7.5 Einfluss der Biomasseanfangsbeladung

Bei der Untersuchung von LentiKats® mit *K. pneumoniae* S6 mit sehr unterschiedlichen Biomasseanfangsbeladungen von 1,5 mg und 500 mg BTM je Liter Gel wurden in *batch*-Fermentationen sehr unterschiedliche spezifische Aktivitäten gefunden (LUTZ 1999).

Aus theoretischen Überlegungen ist klar, dass die Anfangsbeladung des Hydrogels mit einzelnen, teilungsfähigen Zellen von entscheidender Bedeutung für die erreichbare Leistungsfähigkeit der resultierenden immobilisierten Biokatalysatoren ist (3.2.5). Aus diesen Gründen und aus Gründen der Wirtschaftlichkeit sollte die Menge der immobilisierten Biomasse nicht zu hoch gewählt werden.

Bei Clostridien ist es im Gegensatz zu *K. pneumoniae* nicht ohne weiteres möglich, die zu immobilisierende Biomasse durch Zentrifugieren aufzukonzentrieren, da hierbei der Zutritt von Sauerstoff nur aufwändig zu vermeiden ist. Daher ist es sinnvoll, die Zellsuspension *direkt* mit der PVA-Lösung zu verrühren. Damit ist durch die in der einfachen Vorkultur erreichbare Zellzahl von etwa 5×10^8 Zellen je mL und den Anteil von 20 %, der bei der Vorbereitung der PVA-Lösung für die Zugabe der Biomasse maximal reserviert werden kann, die maximale Biomasseanfangsbeladung für die Experimente vorgegeben.

Um für *C. butyricum* die optimale Biomasseanfangsbeladung (BAB) experimentell zu ermitteln, wurden *anaerob* Immobilisate mit sechs verschiedenen BAB von 10^5 (Ansatz **a**) bis 10^8 (Ansatz **f**) Zellen je mL hergestellt. Abbildung 7-10 zeigt den Vergleich der sechs verschiedenen beladenen LentiKats®.

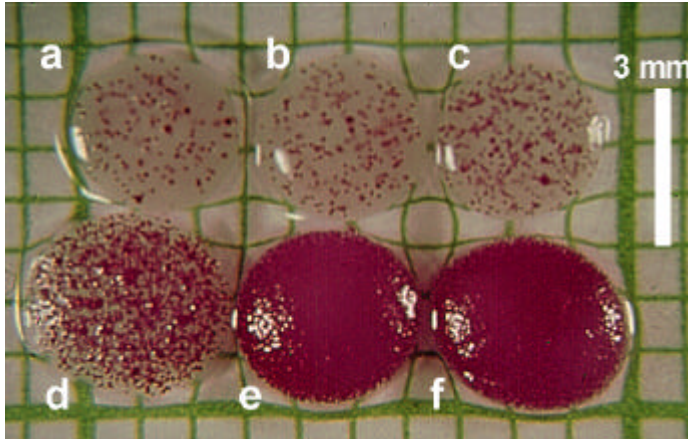


Abbildung 7-10: LentiKats® mit *C. butyricum* NRRL B-1024 bei unterschiedlicher BAB, *anaerob* hergestellt, etwa 80 h inkubiert.

Medium: MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵,
Start pH 7,5, $J = 35^\circ\text{C}$, $c_B \sim 25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Anfangsbeladung (Zellen je mL):

a	100.000	(1×10^5)
b	500.000	(5×10^5)
c	2.000.000	(2×10^6)
d	10.000.000	(1×10^7)
e	50.000.000	(5×10^7)
f	100.000.000	(1×10^8)

Die Abbildung verdeutlicht die unterschiedliche Koloniedichte, die im Immobilisat vorliegt. Eine Zählung der Kolonien in den am geringsten beladenen LentiKats® (Ansatz **a**) ergab einen durchschnittlichen Wert von 120 je Gel-Linse. Bei einem Durchmesser von 3,2 mm und einer Dicke von 0,3 mm beträgt der theoretische Wert 129 Kolonien je LentiKat®. Dies zeigt, dass man bei *anaerober* Herstellung von einer sehr hohen Überlebensrate ausgehen kann.

Die verschiedenen Immobilisate wurden nach Zellanzucht im Gel und Erreichen des *steady state* im Schüttelkolben untersucht. Die spezifische Aktivität zu diesem Zeitpunkt ist in Abbildung 7-11 gezeigt.

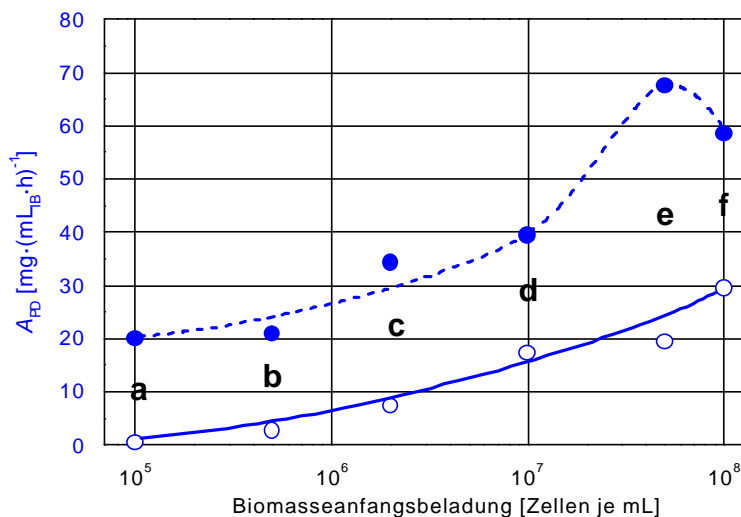


Abbildung 7-11: Spezifische Aktivität unterschiedlich beladener LentiKats® mit *C. butyricum* NRRL B-1024 nach Zellanzucht im Gel und Erreichen des *steady state* im Schüttelkolben.

Medium: MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵,
Start pH 7,5, $J = 35^\circ\text{C}$,
 $c_B \sim 25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Legende:

----- 7. Inkubation
———— 3. Inkubation

Die Abbildung zeigt, dass die hochbeladenen Immobilisate aus Ansatz **f** schon zu dicht besiedelt sind. Das Optimum liegt hier bei einer Beladung von 5×10^7 Zellen je mL (Ansatz **e**). Bei der Bewertung dieser Resultate für die weitere, *aerobe* Immobilisierung von *C. butyricum* in LentiKats® müssen zwei Aspekte berücksichtigt werden. Zum einen kann durch weiteres Zellwachstum die Biomasse im Gel weiter ansteigen und dadurch das Optimum in Richtung niedrigerer Anfangsbeladung verschoben werden. Zum anderen sinkt die Überlebensrate bei aerober Her-

stellung (vgl. 7.6.1 und 7.6.2), d.h. zur Kompensation muss mehr Zellsuspension zugegeben werden. Diese beiden Aspekte sind gegenläufig, sodass man die obige Abbildung lediglich als Orientierungshilfe betrachten kann. Bei aerober Herstellung sollte eine BAB von etwa von 5×10^7 Zellen je mL Gel angestrebt werden.

In der Praxis muss die aerobe Herstellung der LentiKats® mit *C. butyricum* so durchgeführt werden, dass die resultierenden Immobilisate bei der mikroskopischen Kontrolle eine Koloniedichte im Bereich zwischen Ansätzen **d** und **e** zeigen. Diese Kontrolle ist schon nach eintägiger Inkubation und anschließender Färbung der Immobilisate optisch schnell und problemlos möglich (Abbildung 7-12).

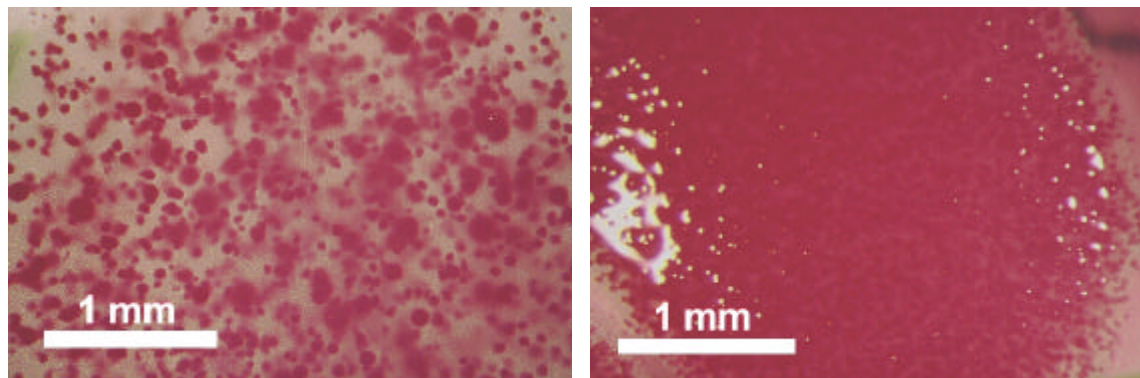


Abbildung 7-12: LentiKats® mit *C. butyricum*, anaerob hergestellt, etwa 80 h inkubiert. Unterschiedliche Anfangsbeladung: *links*: Ansatz **d** mit 1×10^7 Zellen je mL Gel, *rechts*: Ansatz **e** mit 5×10^7 je mL Gel.

7.6 Herstellung von LentiKats®

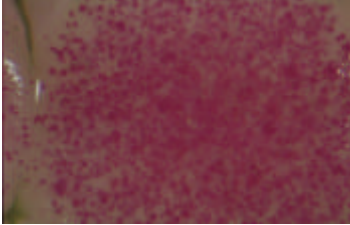
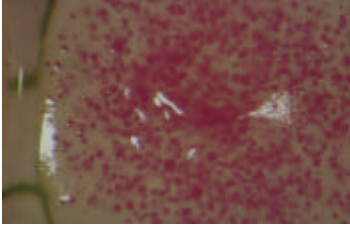
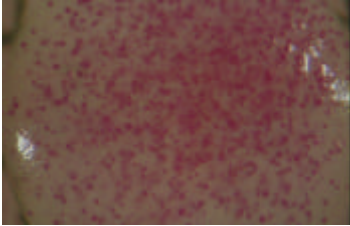
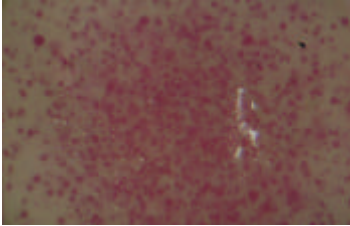
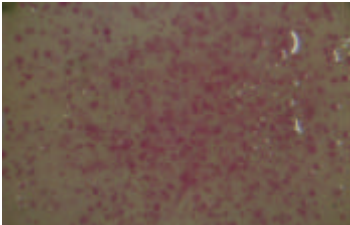
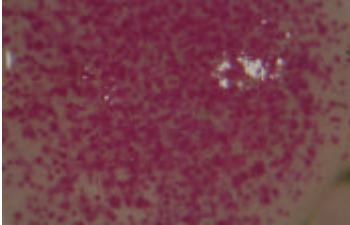
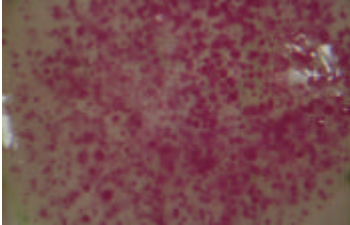
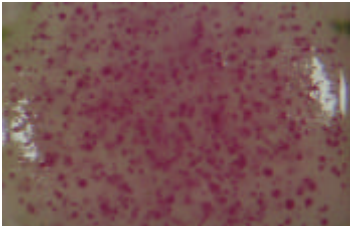
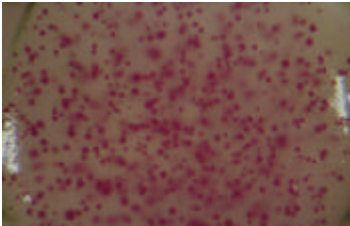
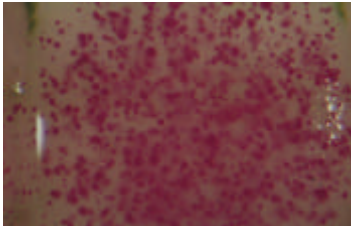
7.6.1 Trocknungszeit

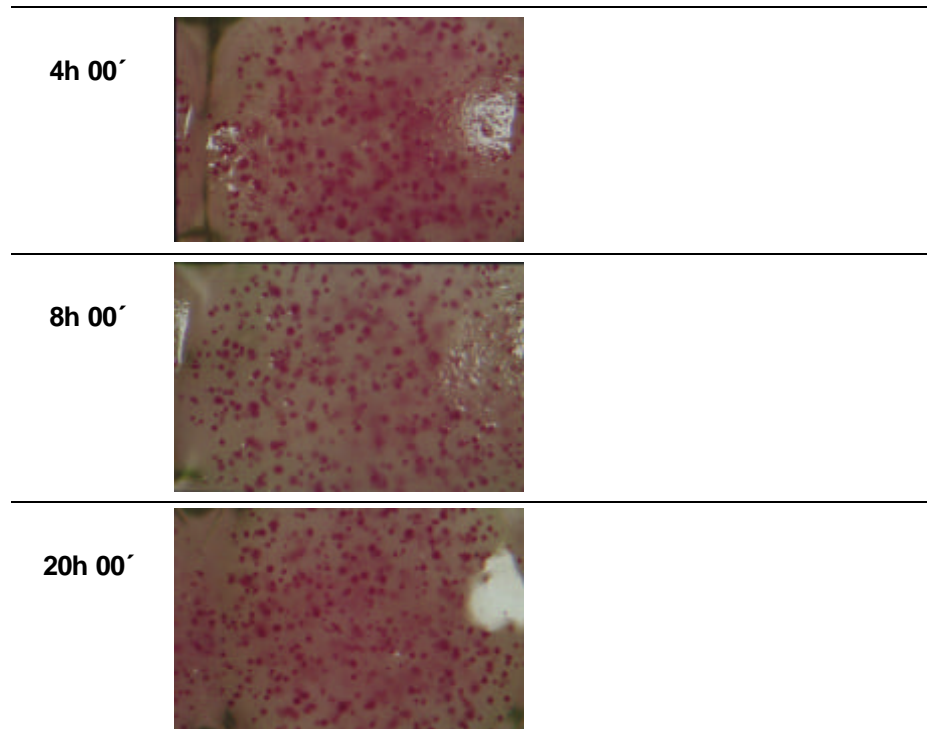
Bei aerober Herstellung von LentiKats® mit *C. butyricum* bedeutet eine längere Trocknungszeit vor allem eine längere Sauerstoffexposition der Clostridienzellen. Für eine höhere Überlebensrate sollte daher die Trocknungszeit minimal sein. Die untere Grenze hierfür wird zum einen durch Eigenschaften der Trockenluft, die Luftbewegung, die Tropfenmenge sowie die Zusammensetzung der Tropfen und zum anderen durch die gewünschten Spezifika der Immobilisate, wie etwa die Überlebensrate oder die mechanischen Eigenschaften, bestimmt.

In der Praxis konnten unter günstigen Bedingungen Trocknungszeiten von etwa 15 Minuten realisiert werden. Abhängig von der Menge der zu trocknenden LentiKats® sowie der jeweiligen Trockenluft im Labor dauerte der Trocknungsvorgang bis zu 60 Minuten. Um den Einfluss der Trocknungszeit auf die spätere Koloniezahl zu klären, wurden LentiKats® mit *C. butyricum* in Zeiten zwischen 15 Minuten und etwa einem Tag *aerob* getrocknet. Parallel zu den normalen Ansätzen wurde ein Ansatz durchgeführt, bei dem $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Cystein zugesetzt wurden. So sollte untersucht werden, ob es möglich ist, durch dieses externe Reduktionsmittel das Redoxpotenzial niedrig zu halten und die schädigende Wirkung von Sauerstoff zu mildern. Die Biomasseanfangsbeladung betrug $1,9 \times 10^7$ Zellen je mL.

Für die Bewertung der Ansätze wurde die Besiedelungsdichte mit Kolonien der LentiKats® aus den jeweiligen Ansätzen nach einer Inkubation von 24 h herangezogen. Tabelle 7-6 zeigt stereomikroskopische Aufnahmen von LentiKats® aus den verschiedenen Ansätzen.

Tabelle 7-6: Stereomikroskopische Aufnahmen von gefärbten LentiKats[®] mit *C. butyricum*, die unterschiedlich lang getrocknet wurden, nach einer Inkubation von 24 h.

Dauer der Trocknung	PVA-Lösung <i>ohne</i> Cystein	PVA-Lösung <i>mit</i> Cystein
15'		
30'		
45'		
1h 00'		
1h 30'		
2h 00'		



Eine quantitativ exakte Bewertung der Ansätze, beispielsweise durch Zählung der Kolonien im Gel, ist aufgrund ungleichmäßiger Belichtung und Größe der Immobilisate sehr schwierig. Der Vergleich mit den Referenzansätzen aus Abbildung 7-10 zeigt, dass im vorliegenden Versuch auch bei aerober Herstellung eine hohe Überlebensrate erzielt wurde. Die Koloniedichte der Ansätze bis 1 h liegt im Bereich von Ansatz d (Abbildung 7-10), was einer Überlebensrate von etwa 50 bis 60 % entspricht. Bei den Ansätzen ab 2 h Trocknungsdauer halbiert sich die Koloniezahl noch einmal. Insgesamt wurde also bei sehr langer Trocknungszeit ÜR von etwa 25 bis 30 % erreicht. Die entstandenen Kolonien dürften auf sauerstoffresistente Sporen zurückgehen. Die zweifelsfreie Bestimmung der Zahl solcher Sporen im Inokulum ist schwierig. Bei Zählung in der Zählkammer liegen typische Werte im Bereich von 10 bis 25 % der Gesamtzellzahl.

Trotz der Mängel bei der quantitativen Auswertbarkeit des durchgeführten Experiments lassen sich wichtige Aussagen treffen: Bis zu einer Trocknungsdauer von etwa 1 h werden die aeroben Bedingungen von etwa der Hälfte der Zellen toleriert. Dabei erweisen sich 15 Minuten nicht zwingend günstiger als 1 h. Offenbar ist ein bestimmter Anteil der Zellen, hier etwa 50 bis 60 %, in der Lage, einen einstündigen Sauerstoffzutritt zu überleben. Die übrigen Zellen sterben innerhalb der ersten 15 Minuten ab. Im Bereich zwischen etwa 1 h und 2 h kann man eine Abnahme der Besiedelungsdichte der Gel-Linsen erkennen. Ab 2 h ist die Besiedelung weniger dicht, aber weitgehend unabhängig von der Dauer der Trocknung.

Ein Vergleich der beiden Ansätze nach einer Trocknungszeit von 2 h zeigt, dass der Zusatz von L-Cystein zur PVA-Lösung die tolerierte Trocknungsdauer verlängert.

7.6.2 Unterschiedliche Rückquellmedien

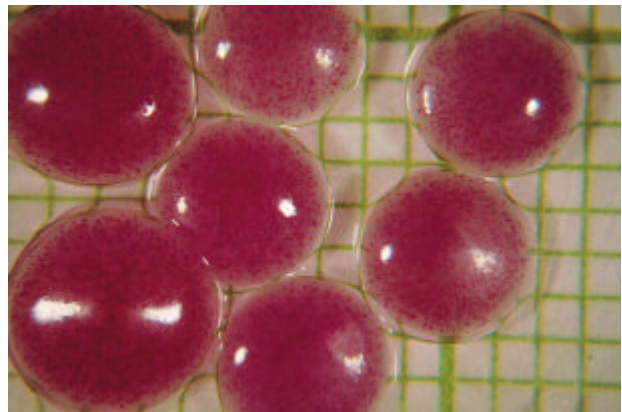
Für eine spätere großtechnische Herstellung von LentiKats® mit *C. butyricum* ist ein Übergießen mit Mineralsalzmedium unwirtschaftlich. Daher sollte eine günstigere Lösung gefunden werden, die sich für das Stabilisieren der LentiKats® eignet, gleichzeitig aber keine Beeinträchtigung der Zellen in den Gel-Linsen bedeutet, z.B. durch Substratmangel während der Immobilisierung.

Im Mineralsalzmedium sind eine Reihe von Salzen enthalten, die für die Stabilisierung der Gel-Linsen notwendig sein könnten. Als kostengünstigere Alternativen zum anaeroben Medium (1) wurde zum einen eine *aerobe* LentiKat® Stabilizer-Lösung (2) und zum anderen eine *anaerobe* LentiKat® Stabilizer-Lösung mit $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Cystein (3) verwendet.

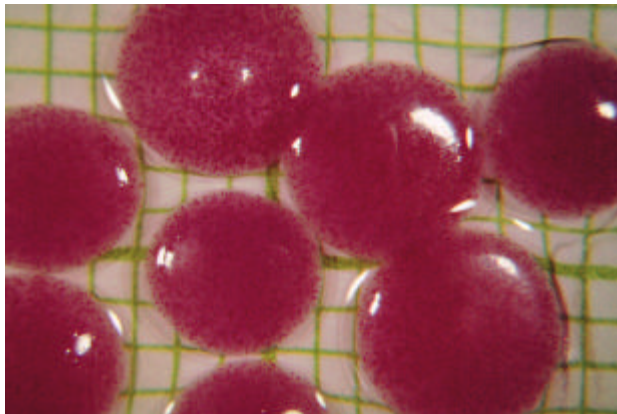
Es wurden LentiKats® mit einer hohen BAB von $1,1 \times 10^8$ Zellen je mL aerob hergestellt. Der Trocknungsvorgang wurde bei Erreichen der Zielmasse durch Übergießen mit jeweils einem der drei Rückquellmedien gestoppt. Die Immobilisate wurden anschließend anaerob in MinS⁶⁶N¹⁰⁰RG²⁵ inkubiert. Nach 20 h wurden Immobilisatproben entnommen, gefärbt und mikroskopiert. Das Resultat zeigt Abbildung 7-13.

Abbildung 7-13: Einfluss dreier verschiedener Rückquellmedien (1) bis (3) auf die ÜR und Koloniebildung in LentiKats® mit *C. butyricum* NRRL B-1024. Medium: MinS⁶⁶N¹⁰⁰RG²⁵, Start pH 7,5, $J = 35 \text{ °C}$, $c_B \sim 25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Es wurde das übliche RG *ohne* erkennbare Ölschicht für das Mineralsalzmedium verwendet.

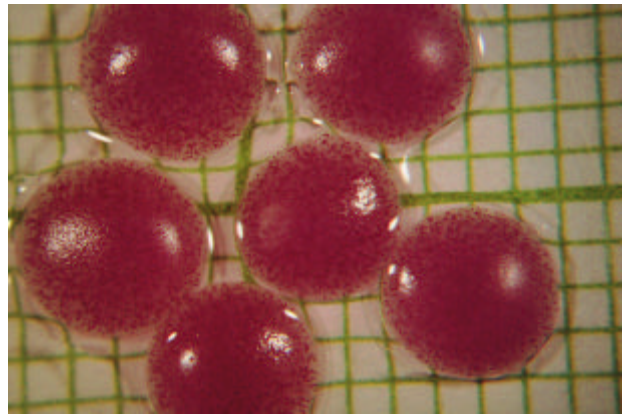
(1) Medium



(2) *aerobe* Stabilizer-Lösung



(3) *anaerobe* Stabilizer-Lösung + Cystein



Die Besiedlungsdichte liegt allgemein etwas niedriger als diejenige von Ansatz **e** (Abbildung 7-12). Die absolut erreichte ÜR liegt im Bereich von 40 bis 50 %. Die Fotos in Abbildung 7-13 zeigen, dass das verwendete Rückquellmedium keinen signifikanten Einfluss auf die Koloniedichte in den LentiKats® hat. Dies bedeutet, dass auch die nach Herstellerangabe sehr kostengünstige Stabilizer-Lösung verwendet werden kann.

7.7 Untersuchungen im Schüttelkolben

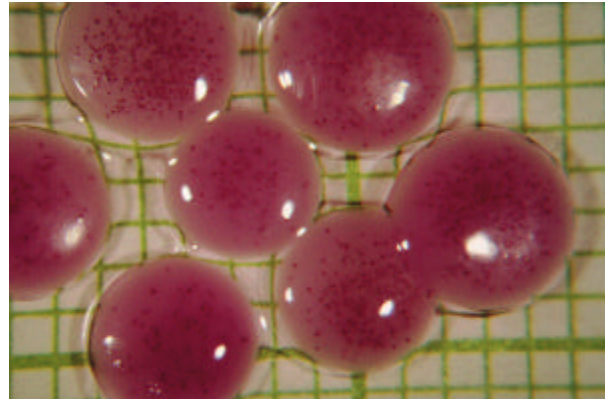
7.7.1 Beeinträchtigung der Koloniebildung durch Verunreinigungen im Rohglycerin

Die mit verschiedenen Rückquellmedien nachbehandelten Immobilisate aus dem in Abschnitt 7.6.2 beschriebenen Experiment wurden nach der Herstellung auf zwei verschiedenen Mineralsalzmedien kultiviert, die sich lediglich in der verwendeten Rohglycerin-Charge unter-

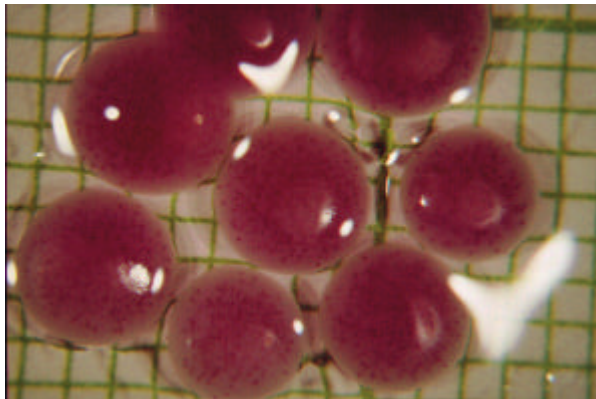
schieden. Die Ergebnisse mit der RG-Charge *ohne* erkennbare Ölphase sind in Abbildung 7-13 gezeigt. Bei Verwendung einer RG-Charge *mit* aufgelagerten Öltropfen (Tabelle 7-3) ergibt sich folgendes Bild (Abbildung 7-14):

Abbildung 7-14: Einfluss dreier verschiedener Rückquellmedien (1) bis (3) auf die ÜR und Koloniebildung in LentiKats® mit *C. butyricum* NRRL B-1024. Medium: MinS⁶⁶N¹⁰⁰RG²⁵, Start pH 7,5, $J = 35\text{ °C}$, $c_{IB} \sim 25\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Es wurde RG *mit* einer deutlich sichtbaren Ölschicht für das Mineralsalzmedium verwendet.

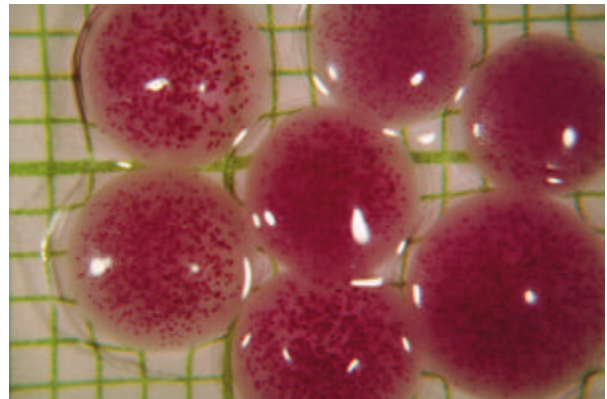
(1) Medium



(2) *aerobe* Stabilizer-Lösung



(3) *anaerobe* Stabilizer-Lösung + Cystein



Der Vergleich der Fotos in Abbildung 7-13 und Abbildung 7-14 zeigt, dass die ölige Phase das Zellwachstum in den Gel-Linsen beeinträchtigt. Die Besiedelungsdichte ist deutlich geringer. In anderen Experimenten wurde teilweise gar kein Zellwachstum von *C. butyricum* in den LentiKats® gefunden, wenn die ölhaltige RG-Charge verwendet wurde. Die Menge an Ölphase spielt hier eine wichtige Rolle. Das Experiment zeigt, dass unbedingt auf eine Entfernung der öligen Phase aus Rohglycerinen geachtet werden muss.

7.7.2 Substratlimitierung immobilisierter Clostridien

In frühen Experimenten wurden in Parallelansätzen unterschiedliche Mengen von LentiKats® mit *C. butyricum* aus der gleichen Charge inkubiert, um eine mögliche Limitierung der PD-Bildung durch Nährstoffe zu erkennen.

Die Biomasseanfangsbeladung betrug $6,2 \times 10^7$ Zellen je mL. Die Herstellung der Immobilisate mit Auftropfen und Trocknen erfolgte anaerob in der A-Bank. Anschließend wurden die LentiKats® in MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵ bei 30 °C mit $c_{IB} \sim 20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ für etwa 70 h inkubiert, wobei der ÜS mehrfach gewechselt wurde. Die so vorkultivierten, bewachsenen LentiKats® wurden nun parallel in vier 40-mL-Ansätzen mit Konzentrationen von 6,1 - 13,0 - 26,5 und 64,9 g IB je L kultiviert. Abbildung 7-15 zeigt die in den einzelnen Ansätzen mit den LentiKats® erzielten Werte für die Produktivität und spezifische Aktivität für PD.

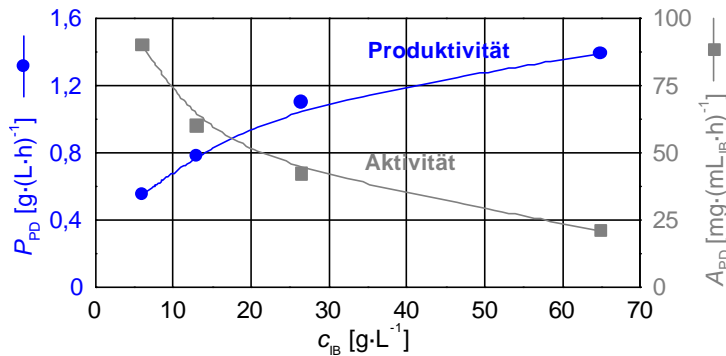


Abbildung 7-15: Versuche zur Nährstofflimitierung von LentiKats® mit *C. butyricum*.

Medium: MinS⁶⁶N¹⁰RG²⁵, Start pH 7,5, $J = 30$ °C

Die maximal erreichte A_{PD} von $90 \text{ mg} \cdot (\text{mL}_{IB} \cdot \text{h})^{-1}$ zeigt das große Potenzial von LentiKats® für die PD-Herstellung. Schon auf Basis dieses Experiments im nicht pH-kontrollierten Schüttelkolben errechnet sich bei einem angestrebten Immobilisatanteil im Reaktor von 25 % eine PD-Produktivität von fast $25 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ - vorausgesetzt, die große Biomassemenge lässt sich optimal mit Nährstoffen versorgen. Die Abbildung zeigt jedoch, dass auch schon bei verhältnismäßig niedrigen Immobilisatkonzentrationen eine deutliche Limitierung festzustellen ist. Weder steigt die Produktivität proportional zu c_{IB} an, noch wird bei hohen Werten für c_{IB} ein vergleichbar hohe spezifische Aktivität erreicht wie bei niedrigen Werten. Einschränkend muss gesagt werden, dass die gezeigte Messung nicht unabhängig ist vom in den Ansätzen mit hoher c_{IB} schneller abfallenden pH-Wert und von stärker steigenden Produktkonzentrationen. Dennoch ist das Ergebnis deutlich.

Verschiedene Gründe für die beobachtete Limitierung sind denkbar. Neben einer mangelnden Durchmischung durch den Rührkern bei größerer Immobilisatmenge (externe Limitierung) ist vor allem die Limitierung durch Nährstoffe wahrscheinlich. Bei mikroskopischer Untersuchung sehr dicht bewachsener Gel-Linsen zeigt sich, dass der BFM-Anteil bis zu 50 % der Immobilisatmenge betragen kann (LUTZ 1999). So ergibt sich für den Ansatz mit einer c_{IB} von $64,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ein möglicher BTM-Gehalt im gesamten Reaktionsvolumen von etwa $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Die BTM von Mikroorganismen enthält typischerweise 7 bis 12 % Stickstoff (EINSELE *et al.* 1985). Dies bedeutet, dass bis zu $0,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ N im Medium enthalten sein müssten. Tatsächlich enthält das Mineralsalzmedium mit dem niedrigen N-Gehalt nur 10 mM Stickstoff, also $0,14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Für nachfolgende Experimente wurde bei der Kultivierung von immobilisiertem *C. butyricum* der N-Gehalt auf $5,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4Cl erhöht, was 100 mM entspricht.

7.8 Laugezugabe als Maß für die PD-Bildung

Um zu gewährleisten, dass die Biomasse im Fermenter immer optimal mit Glycerin versorgt ist, ist eine ständige Kontrolle der Glycerinkonzentration im Medium wünschenswert. Die durchgeführte HPLC-Analytik nach manueller Probenahme ist aufwändig und daher nur bedingt für eine schnelle Kontrolle des Fermentationsherganges geeignet.

Bei der anaeroben Glycerinumsetzung zu PD werden stets auch Säuren gebildet. Daher wurde bei den durchgeführten Fermentationen der pH-Wert durch Zugabe konzentrierter NaOH_{aq} konstant gehalten. Die je Zeiteinheit und Volumen zuzudosierende Laugemenge kann daher als Maß für die Aktivität der PD bildenden Biomasse herangezogen werden. Die Verlässlichkeit dieser Abschätzung ist natürlich stark von der Konstanz des Produktspektrums abhängig.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fermentationen hat sich die Laugezugabe als sehr nützliches Maß zur Kontrolle der Umsetzung erwiesen. Anhand der zugegebenen Laugemenge kann bei *batch*-Fermentationen die gebildete PD-Menge und damit auch die noch

verbliebene Glycerinmenge recht gut abgeschätzt und im Falle von *fed-batch*-Fermentationen gegebenenfalls Glycerin nachdosiert werden. In den verschiedenen Experimenten hat sich ein Wert von etwa 0,8 g gebildetem PD je 1,0 g zuzugebener 8 M NaOH als brauchbar erwiesen. Dies entspricht einem Verhältnis von etwa 0,76 mmol NaOH je mmol PD. Bei elektronischer Datenerfassung kann das Signal der bereits zugegeben Laugemenge sowie die aktuelle Menge je Zeiteinheit für die automatische Steuerung einer Fermentation, insbesondere bei der Glycerinfütterung, herangezogen werden. Basierend auf einer Ausbeute von 0,5 g PD je g Glycerin müssen zur Konstanthaltung der Glycerinkonzentration in einer *fed-batch*-Fermentation etwa 1,6 g Glycerin je zudosiertem Gramm 8 M NaOH nachgefüllt werden.

Bei den kontinuierlichen Fermentationen ist bei konstantem Zulauf eine schnelle Kontrolle der Zellaktivität durch Beobachtung der Laugezugabe möglich. Die automatische Datenerfassung mit der *DASYlab*® Software ermöglicht die einfache Visualisierung der „Aktivität des Fermenters“ durch Darstellung des abgeleiteten Laugesignals.

Bei Nutzung der Laugezugabe zur Fermentationskontrolle muss bedacht werden, dass letztendlich der pH-Wert des Mediums als Messsignal dient, der nicht ausschließlich von der Säurebildung der Biomasse beeinflusst wird. Wichtige Störgrößen sind beispielsweise die Begasung mit Stickstoff, die zum Entfernen von gelöstem CO₂ aus dem Medium führt, sowie der pH-Wert des zufließenden Mediums bei kontinuierlichen Fermentationen.

7.9 Untersuchung von LentiKats® in batch- und fed-batch-Fermentationen

Die Fermentationen wurden in einem Reaktionsvolumen zwischen 500 und 1000 mL durchgeführt. Die zum Erreichen der gewünschten c_B von 200 g · L⁻¹ benötigte Menge von etwa 100 g LentiKats® wurde mit dem LentiKat® Printer hergestellt. Es wurden dabei je Platte etwa 2,0 bis 2,2 g Polymerlösung aufgetropft. Da die vorhandene Trockenkapazität nur für 35 Platten ausgelegt war, wurden die LentiKats® in zwei Chargen im Abstand von 2 h mit jeweils eigener Vorkultur hergestellt, um gleiche Bedingungen für die zu immobilisierende Biomasse zu gewährleisten. Die standardisierte Vorkultur wurde mit 20 % (v/v) eingesetzt (BAB etwa 10⁸ Zellen · mL⁻¹) - bei einer Überlebensrate der Clostridien zwischen 10 und 50 % ergeben sich damit Immobilisate, deren Koloniedichte im optimalen Bereich liegen sollte (7.5). Die Koloniedichte wurde nach der Vorkultivierung in der AB mikroskopisch kontrolliert.

7.9.1 Anzucht der Biomasse

Die LentiKats® mit *C. butyricum* wurden für etwa 24 h in der Anaerobierbank mit einer c_B von etwa 200 g · L⁻¹ in MinS⁶⁶N¹⁰⁰RG²⁵ bereits in einer Animpfflasche vorkultiviert und erst dann anaerob in das Fermentationsgefäß überführt. Durch die Vorkultivierung sollte eine Schädigung der frisch immobilisierten Zellen bei eventuellem Sauerstoffzutritt während des Animpfens gemindert werden. Sterben einzeln liegende Zellen im Hydrogel ab, so ist diese Stelle als Ursprung für eine Kolonie verloren. Ist die Zelle jedoch bereits zu einer kleinen Kolonie herangewachsen, müsste eine massive Schädigung eintreten, um die gesamte Kolonie, auch den inneren Teil, abzutöten.

Nach Überführung der LentiKats® in das Reaktorgefäß wurde die Biomasse durch Kultivierung in sukzessiven *batch*- und *fed-batch*-Fermentationen angezogen und anschließend permanent mit Nährstoffen versorgt. Die Kultivierungsdauer zwischen zwei Medienwechseln betrug i.d.R. nur wenige Stunden, um einen Nährstoffmangel zu verhindern. Der dadurch bedingte hohe experimentelle Aufwand macht ein gezieltes Herunterfahren der Zellaktivität für Rüstzeiten notwendig. Dies kann beispielsweise durch Absenkung der Temperatur erfolgen.

7.9.2 Temperatursenkung zur Lagerung der LentiKats®

Es wurde untersucht, welchen Einfluss eine Absenkung der Temperatur im Fermenter auf die Aktivität der immobilisierten Zellen hat. Neben der bereits erwähnten Notwendigkeit für die experimentelle Arbeit könnte eine Temperaturabsenkung auch für den späteren Prozess wichtig sein, um z.B. bei Störungen beim *up-* oder *down-stream-processing* die Produktivität zu steuern. Auch für die Lagerung und den Transport von Immobilisaten spielt die Kühlung eine Rolle. Im Verlauf der Experimente wurde eine Reihe kurzer *batch*-Fermentationen bei unterschiedlichen Temperaturen gefahren. Abbildung 7-16 zeigt die sich ergebende Abhängigkeit der Produktivität von der Temperatur.

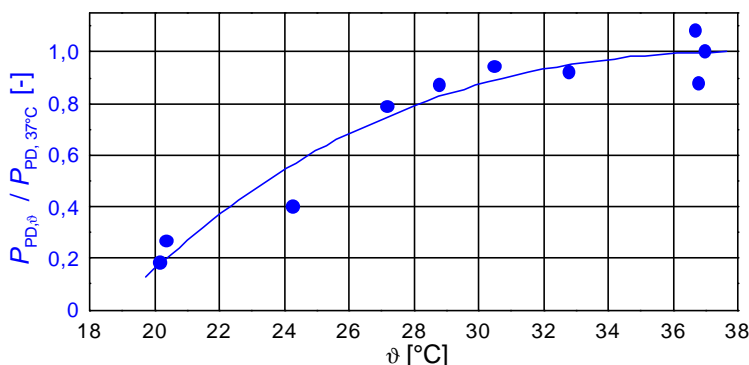


Abbildung 7-16: Temperaturabhängigkeit der Produktivität von LentiKats® mit *C. butyricum* im suboptimalen Bereich. Die Werte sind auf die erzielte P_{PD} bei 37 °C normiert.

Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰,
 V_R 1000 mL, c_B ~100 g · L⁻¹,
 pH 7,0

Bei einer Absenkung der Temperatur um 10 K sinkt die Produktivität um ein Viertel, bei Verringerung um 17 K gar auf nur ein Fünftel.

Für die Eignung eines Verfahrens zum gezielten Absenken der Aktivität ist entscheidend, wie gut sich anschließend die ursprüngliche Aktivität wieder erreichen lässt. Die folgende Abbildung 7-17 zeigt, dass in der untersuchten Fermentationsfolge aus drei *batches* I bis III durch Temperaturabsenkung die PD-Bildung vorübergehend auf etwa ein Viertel gesenkt werden konnte. Nach etwa 14 h konnte durch Einstellen der ursprünglichen Temperatur auch praktisch sofort wieder die gleiche Produktbildung erreicht werden.

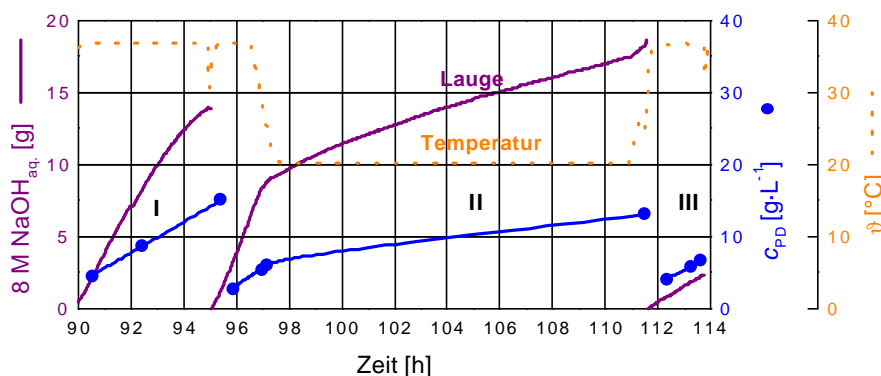


Abbildung 7-17: Regeneration der PD-Bildung immobilisierter Clostridien nach einer Kühlphase von 14 h.

Die Abbildung zeigt auch, wie gut sich innerhalb eines *batches* auch ohne die vorliegenden Werte aus der HPLC der prinzipielle Fermentationsverlauf aus der Menge der zugegebenen Lauge nachvollziehen lässt. Die Gründe für die stark unterschiedliche Laugezugabe von I und III sind unklar. Die zu Ungunsten von n-Butyrat erhöhte Acetatbildung in III führte bei anderen *batches* nicht zu einer geringeren Laugezugabe. Möglicherweise ist eine unterschiedliche Be-gasung des Fermenters die Ursache. Die Optimumstemperatur für *C. butyricum* in LentiKats® wurde in kontinuierlicher Fermentation ermittelt (vgl. 7.10.2).

7.9.3 Verwertung verschiedener Rohglycerine

Die Verwertung verschiedener Rohglycerine durch immobilisierte Zellen von *C. butyricum* wurde in einer Serie von kurzen *batch*-Fermentationen untersucht. Die Nutzung dieser kostengünstigen Rohstoffe ist essentiell für einen wirtschaftlichen Prozess.

Es wurden Immobilisate mit einer BAB von $8,7 \times 10^7$ Zellen je mL untersucht, die bis zum Erreichen einer stabilen Aktivität fermentiert worden waren. Die c_B der Fermentationen betrug etwa $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Temperatur wurde bei 38°C , der pH-Wert bei 7,5 gehalten. Die Glycerinkonzentration betrug zu Beginn jeweils zwischen 60 und $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

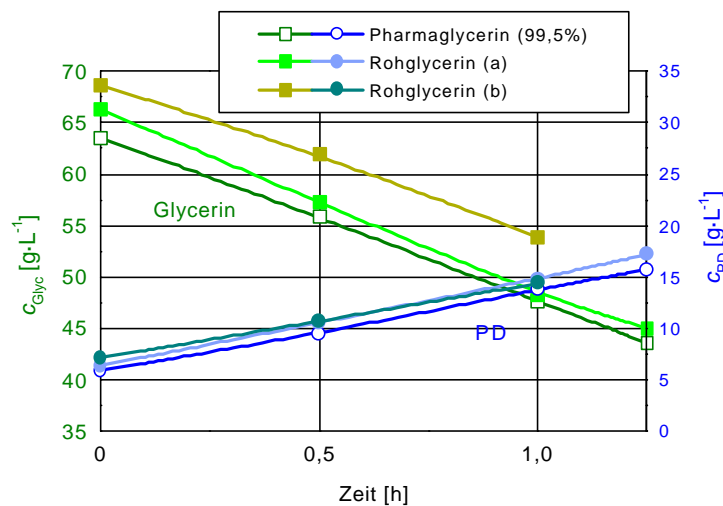


Abbildung 7-18: Nutzung verschiedener aufkonzentrierter Rohglycerine durch *C. butyricum* immobilisiert in LentiKats®. Die Rohglycerine (a) und (b) mit 77,9 und 88,0 % Glycerin stammen aus der Biodieselherstellung. Zum Vergleich ist die Umsetzung von Pharmaglycerin (99,5 %) gezeigt.

Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰, V_R 500 mL, $c_B \sim 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,5, $J = 38^\circ\text{C}$

Abbildung 7-18 zeigt, dass beide Rohglycerine ohne signifikante Einbußen im Vergleich zum Pharmaglycerin verwertet werden. Bei allen drei Ansätzen wurde eine P_{PD} von etwa $8 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ erreicht. Die Nebenproduktbildung war praktisch identisch und die PD-Ausbeute lag zwischen 0,58 und 0,61. Die hohen Startwerte für c_{PD} in der obigen Abbildung resultieren vom Restmedium des jeweils vorhergehenden Ansatzes, das beim Austausch des verbrauchten Überstandes gegen frisches Medium im Fermenter zurückbleibt, insbesondere in und zwischen den LentiKats®. Die gute Akzeptanz von Rohglycerinen aus der Biodieselherstellung wurde auch für andere Clostridienstämme bestätigt (PAPANIKOLAOU *et al.* 2000, PETITDEMANGE *et al.* 1995)

Neben Glycerin enthalten die beiden untersuchten Rohglycerine vor allem relativ große Mengen an Salzen. Beide stammen aus der Biodieselherstellung. Es ist zu erwarten, dass Rohglycerine aus anderen Prozessen, etwa der Fettsäure- oder der Verseifung, andere Inhaltsstoffe wie Fette oder Fettsäuren aufweisen, die möglicherweise die PD-Bildung beeinträchtigen. Um die biotechnische Herstellung von PD auf eine breite Rohstoffbasis zu stellen, müssen eine Vielzahl verschiedener Rohglycerine aus unterschiedlichen Bereichen untersucht werden, um mögliche inhibierende Inhaltsstoffe zu identifizieren und gegebenenfalls entfernen oder von vornherein vermeiden zu können.

7.9.4 Glycerininibierung- und -limitierung

Bei suspendierten Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024 wird ab einer c_{Glyc} von etwa $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ eine Inhibierung beobachtet (vgl. 7.1.1). Bei den *batch*-Fermentationen von LentiKats® mit *C. butyricum* wurden in bei den eingesetzten Glycerinstartkonzentrationen von bis zu etwa $110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ keine Aktivitätseinbußen beobachtet. Offenbar ist auch durch den Transport

durch das umgebende Hydrogel die effektive Konzentration an Glycerin etwas geringer als im ÜS der Immobilisate.

Diese Annahme wird durch den gegenüber suspendierten Zellen signifikant erhöhten k_S -Wert für Glycerin gestützt. Abbildung 7-19 zeigt einen Detailausschnitt einer *batch*-Fermentation von LentiKats® mit *C. butyricum*. Die Darstellung ist analog zu derjenigen für suspendierte Zellen in Abbildung 7-5. Nach 4,7 h Stunden wurde der ÜS gewechselt, es wurden also keine weiter sinkenden Glycerinwerte untersucht.

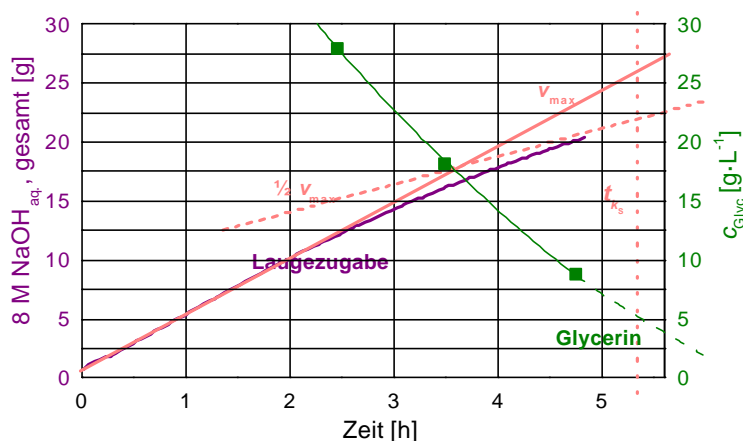


Abbildung 7-19: Detailausschnitt einer *batch*-Fermentation von LentiKats® mit *C. butyricum* zur Abschätzung des k_S -Wertes für Glycerin.

Wenngleich für die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund des zuvor durchgeführten Medienwechsels keine Glycerindaten verfügbar sind, kann der k_S -Wert für die untersuchten immobilisierten Clostridien mit etwa $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glycerin abgeschätzt werden. Dieser gegenüber freien Zellen erhöhte k_S -Wert wurde in kontinuierlicher Fermentation bestätigt (vgl. 7.10.4).

Die Untersuchung zeigt, dass in Fermentationen mit immobilisiertem *C. butyricum* durch eine geeignete Steuerung der Nachfütterung von Glycerin dessen Konzentration stets oberhalb von etwa $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gehalten werden sollte, bevor gegen Ende die Glycerinzufuhr gestoppt wird und der Rest möglichst vollständig zu PD umgesetzt werden soll.

7.9.5 Limitierung durch Nährstoffe

Durch den Einsatz einer großen Menge an bewachsenen LentiKats® im Reaktor ist der Gehalt an Biomasse enorm erhöht – der Grund für die erreichbaren hohen Produktivitäten. Bei einer c_{IB} von $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ und einem Anteil der Biomasse am Immobilisatvolumen von etwa 50 % kann c_{BTM} mit etwa $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ abgeschätzt werden. Diese Konzentration liegt rund zehnfach höher als die Kulturen mit suspendierten Zellen. Daher muss überprüft werden, ob das benutzte Kultivierungsmedium eine so große Biomassemenge ausreichend mit Nährstoffen versorgt oder ob Komponenten limitierend sind. In Abschnitt 7.7.2 wurde für suspendierte Zellen bereits bei relativ kleinen c_{IB} -Werten von $<50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ eine deutliche Limitierung festgestellt. Zum Vergleich wurden verschiedene *batch*-Fermentationen mit der gleichen Menge derselben bewachsenen LentiKats® durchgeführt und das Reaktionsvolumen variiert. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 7-7.

Tabelle 7-7: Kultivierung von LentiKats® mit *C. butyricum* in *batch*-Fermentationen. Variation von V_R bei gleicher Menge derselben bewachsenen LentiKats®. Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG⁶⁵, V_R variiert, c_{IB} variiert, pH 7,5, $J = 38^\circ\text{C}$

Reaktionsvolumen V_R [mL]	490	1000
c_{IB} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	~200	~100
P_{PD} [$\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$]	5,4	3,6

$A_{PD} [\text{mg} \cdot (\text{mL}_B \cdot \text{h})^{-1}]$	26	36
--	----	----

Deutlich zeigt sich auch in den pH-kontrollierten *batch*-Fermentationen eine Limitierung des Biokatalysators bei Verdopplung der c_B von 100 auf 200 g \cdot L⁻¹. Die erreichten Absolutwerte der spezifischen Aktivität sind höher als nach dem Schüttelkolbenexperiment zu erwarten. Ursache sind die Konstanzhaltung des pH-Wertes, die bessere Durchmischung der LentiKats® im Fermenter und vor allem die höhere Temperatur. Dies bedeutet, dass unter Fermentationsbedingungen noch höhere spezifische Aktivitäten zu erreichen sein müssten als die im Schüttelkolben schon erzielten 90 mg \cdot (mL_B \cdot h)⁻¹. Bei den untersuchten *batches* mit einer für den technischen Einsatz relevanten c_B von ~200 g \cdot L⁻¹ ist die Biomasse jedoch offenbar nicht ausreichend versorgt. Weitere Untersuchungen zur Nährstofflimitierung von LentiKats® wurden in kontinuierlicher Fermentation angestellt (vgl. 7.10.6).

93

7.9.6 Produktinhibierung

Für die Produktaufreinigung, sprich die Gewinnung von PD aus der Fermentationsbrühe, ist eine möglichst hohe c_{PD} wünschenswert. Gleichzeitig sollte die Konzentration an noch vorhandenem Glycerin möglichst gering sein. Da die Produkte der anaeroben Glycerinvergärung die Zellen inhibieren, verlangsamt sich die Produktbildung im Laufe der Umsetzung, bis sie schließlich zum Erliegen kommt. Bei zu hoher Produktkonzentration kann es zum Absterben der Zellen kommen. Im Falle von freien Zellen kann ein Teil der bewachsenen Fermentationsbrühe nach der Ernte als Inokulum verwendet werden, im Falle von Immobilisaten ist die wiederholte Nutzung der immobilisierten Biomasse systemimmanent. Daher ist es insbesondere in diesem Fall wichtig, die Umsetzung nicht zu weit zu führen.

In Abbildung 7-20 ist eine *fed-batch*-Fermentation von LentiKats® mit *C. butyricum* gezeigt, bei der eine c_{PD} von 48,5 g \cdot L⁻¹ erreicht wurde. Deutlich ist zu erkennen, wie die Aktivität nach etwa 22 h zurückgegangen ist. In den sich jeweils nach Austausch des Bestandes anschließenden *batches* wird zunächst eine nur langsame PD-Bildung beobachtet. Der Verlauf der Laugezugabe zeigt, dass erst nach 6 bis 10 h die ursprüngliche spezifische Aktivität wieder erreicht wird.

Die in den späteren *batches* wieder erreichte Produktivität wurde zu keinem Zeitpunkt mit freien Zellen erreicht. Dies bedeutet, dass die Konzentration von 48,5 g \cdot L⁻¹ nicht lethal für die immobilisierten Zellen war. In zwei ähnlich durchgeführten Ansätzen wurde nach Erreichen einer c_{PD} von etwa 35 g \cdot L⁻¹ keinerlei Aktivitätseinbuße im jeweils nachfolgenden *batch* festgestellt. PD-Konzentrationen in diesem Bereich werden offenbar also absolut problemlos toleriert. Insgesamt gilt es also, denjenigen Zeitpunkt für das Ende der Umsetzung und die Ernte zu ermitteln, der den besten Kompromiss aus Erhaltung der Zellaktivität und hoher PD-Konzentration darstellt, d.h. eine möglichst hohe c_{PD} soll erreicht werden, ohne dass eine zeitraubende Regeneration der immobilisierten Zellen notwendig ist.

Die Versuche zeigen, dass die Produkttoleranz der immobilisierten Zellen scheinbar geringer ist, als die der freien Zellen. Ein direkter schädlicher Einfluss der Immobilisierung auf die PD-Bildung der Zellen ist dabei unwahrscheinlich. Es kann im Gegenteil eher davon ausgegangen werden, dass der Geleinschluss eine Stabilisierung der Zellen bewirkt (GIBBS *et al.* 1999, GROBOILLOT *et al.* 1994). Möglich ist eine indirekte negative Beeinflussung der erreichbaren Produktkonzentration. Die Diffusion der Produkte im zellfreien PVA-Hydrogel erfolgt sehr schnell (vgl. 5.3). Ein hoher Biomassegehalt der Immobilisate kann sich jedoch negativ auf die Stoffdiffusion im Gel auswirken (SCHARA 1977, VORLOP 1984). Nach einem bei VORLOP gegebenen Zusammenhang kann für sehr dicht bewachsene LentiKats® der effektive Diffusionskoeffizient

im mit Biomasse beladenen Gel demnach auf etwa 30 bis 40 % des Koeffizienten im zellfreien Gel gemindert sein. Möglicherweise ist also der sehr hohe Biomassegehalt der Immobilisate der Grund für die geringe erreichte maximale c_{PD} . Da er gleichzeitig auch die hohen Produktivitäten ermöglicht, gilt es, einen Kompromiss aus erreichbarer Produktivität und erreichbarer Produktkonzentration zu wählen.

Wie bereits weiter oben diskutiert, lässt sich durch optimale Biomasseanfangsbeladung (BAB) die maximale Produktivität erzielen. Da diese maximale Produktivität zu einer relativ niedrigen erreichbaren c_{PD} führt, könnte beispielsweise durch eine niedrigere BAB von vornherein die Produktivität gedrosselt werden. Möglich ist jedoch auch, durch suboptimale Einstellung der Kultivierungsparameter wie etwa der Temperatur oder des pH-Wertes die Produktivität zu senken. Diese beiden Parameter sollten zunächst optimal eingestellt werden, um eine maximale P_{PD} zu erzielen. Wenn die Produktkonzentration ansteigt, sollte die Produktivität gezielt abgesenkt werden. Durch Temperaturabsenkung kann gleichzeitig die Lösungsmitteltoleranz der Zellen erhöht werden, durch Anheben des pH-Wertes das Gleichgewicht die organischen Säuren in Richtung der weniger schädlichen deprotonierten Form gedrängt.

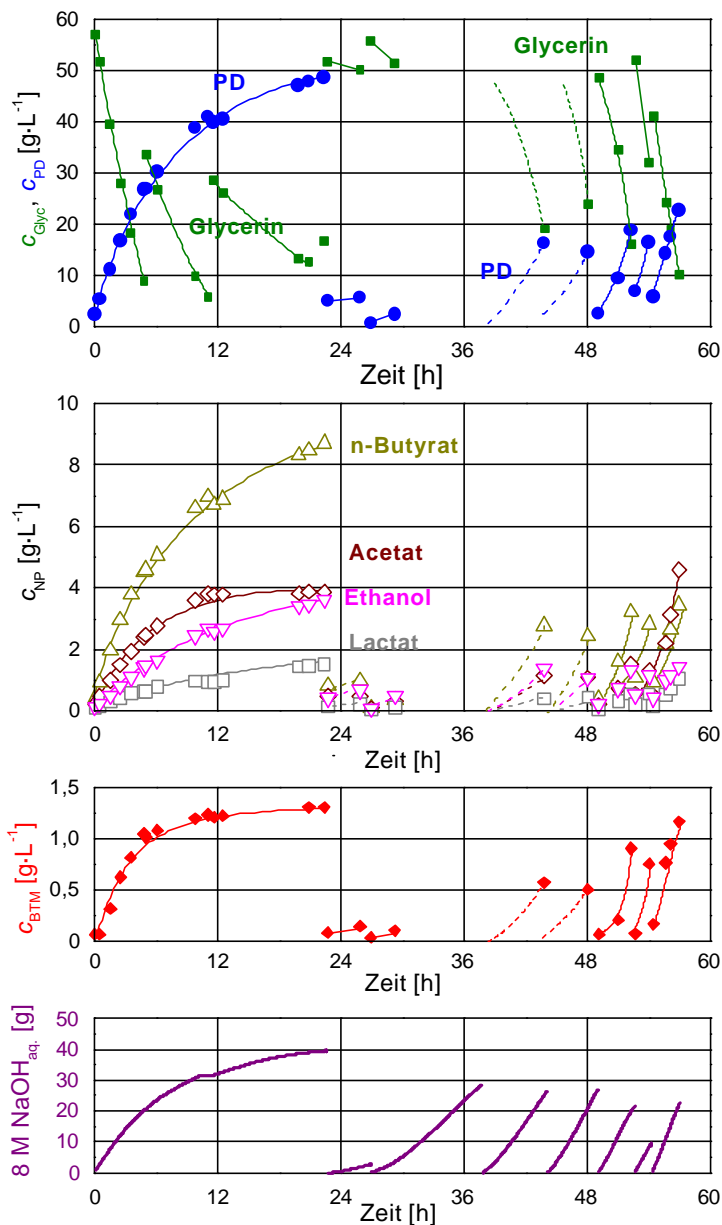


Abbildung 7-20: Sukzessive *fed-batch*- und *batch*-Fermentation von *C. butyricum* immobilisiert in Lenti-Kats®.

Die Abbildung zeigt eine *fed-batch*-Fermentation (0 bis 22 h) bis zu einer c_{PD} von $48,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ und die anschließende Aktivität der Immobilisate in *batch*-Fermentationen nach Austausch des Überstandes. Deutlich ist zu erkennen, wie sich die Aktivität der Biomasse nur allmählich, jedoch vollständig erholt. Da zwischen 29 und 43 h keine HPLC-Daten zur Verfügung stehen, muss für diesen Bereich Menge an zugegebener Lauge den Verlauf der Zellaktivität widerspiegeln, der im unteren Teil der Grafik gezeigt ist. Die vermutlichen Konzentrationsverläufe der Metaboliten und der Biomasse sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Die angegebenen Werte für c_{BTM} beziehen sich ausschließlich auf die Biomasse im Überstand.

Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG, pH 7,5,
 $J = 38 \text{ }^{\circ}\text{C}$

fed-batch: V_R 500 mL, $c_B \sim 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
batches: V_R 1000 mL, $c_B \sim 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

7.9.7 Vergleich immobilisierter und freier Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024

Die PD-Bildung von immobilisierten und freien Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024 ist in Abbildung 7-21 miteinander verglichen. Diese Abbildung kombiniert Daten aus Abbildung 7-4 und Abbildung 7-20.

Zwar sind die Bedingungen, unter denen die beiden *fed-batch*-Fermentationen zustande gekommen sind unterschiedlich, dennoch demonstriert der gezeigte Vergleich einen sehr wichtigen Vorteil der Immobilisierung. Von Beginn der Fermentation an wird mit hoher Produktivität PD gebildet während bei freien Zellen die Biomasse- und PD-Bildung auf geringem Niveau beginnt, obwohl mit 10 % (v/v) Inokulum beimpft wurde. Die Biomasse wird bei Nutzung freier Zellen unweigerlich bei der Ernte aus dem Fermenter entfernt, während die immobilisierte Biomasse erhalten bleibt.

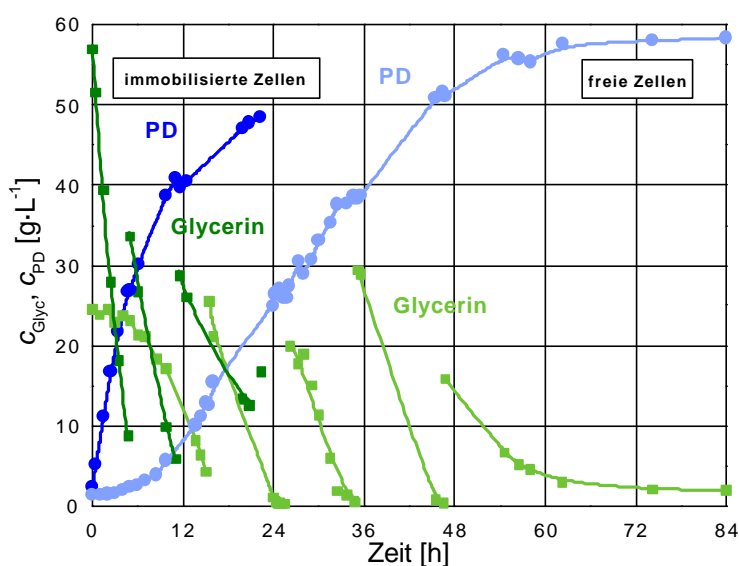


Abbildung 7-21: Vergleich von *fed-batch*-Fermentationen mit immobilisierten und freien Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024.

7.9.8 Kontaminationsgefahr bei batch-Fermentationen

Die Einschlussimmobilisierung von Biokatalysatoren in nicht degradierbare Hydrogele bietet die Möglichkeit des unsterilen Betriebs der Umsetzung. Die gewünschte Biomasse ist im Gel vor Fremdkeimen geschützt, die nicht ins Gelnetzwerk eindringen können und gegebenenfalls mit dem Überstand entfernt werden können – im *batch* bei der Ernte und im kontinuierlichen Betrieb permanent. Da der immobilisierte Biokatalysator nicht direkt geschädigt oder verdrängt wird, hängt der Schaden für die Umsetzung durch etwaige Kontaminationen beispielsweise vom Anteil des Glycerins ab, das durch zusätzliche Nebenproduktbildung für die PD-Bildung verloren geht – mit der Folge einer sinkenden Y_{PD} .

Abbildung 7-22 zeigt eine Folge von vier *batch*-Fermentationen, die wie stets im nicht sterilen Gefäß und mit unsterilem Medium durchgeführt wurden. Im zweiten *batch* (II) wurde eine erheblich erhöhte Ethanolbildung beobachtet, was auf das Auftreten einer Kontamination zurückgeführt wurde, da Ethanol von *C. butyricum* NRRL B-1024 nur in sehr geringen Mengen aus Glycerin gebildet wird. Die gleiche PD-Produktivität von I und II zeigt, dass die mögliche Kontaminante nicht die immobilisierte Biomasse behindert. Wie PD werden auch n-Butyrat und Acetat praktisch unverändert weiter produziert. Ethanol wird also quasi nebenher produziert. Die folgenden *batches* III und IV zeigen, dass die Kontamination sich nicht durchsetzen konnte, son-

dern das praktisch gleiche Nebenproduktspektrum gebildet wurde wie zuvor. Den Einfluss der Kontamination auf die PD-Ausbeute im *batch* spiegelt Tabelle 7-8 wider.

Tabelle 7-8: Sukzessive *batch*-Fermentation von *C. butyricum* immobilisiert in LentiKats®. Die Daten für die Ausbeuten von PD und den Nebenprodukten zeigen das wahrscheinliche Auftreten einer Kontaminante in *batch II*. Es wird vermehrt Ethanol gebildet, daher sinkt Y_{PD} . In den *batches III* und *IV* ist nach dem erfolgten Medienwechsel keine Kontamination mehr festzustellen.

<i>batch</i> -Fermentation	I	II	III	IV
Y_{PD} [mol· mol ⁻¹]	0,62	0,53	0,61	0,62
Y_{But} [mol· mol ⁻¹]	0,09	0,09	0,10	0,10
Y_{Ac} [mol· mol ⁻¹]	0,09	0,04	0,05	0,07
Y_{Lac} [mol· mol ⁻¹]	0,00	0,02	0,00	0,01
Y_{EtOH} [mol· mol ⁻¹]	0,01	0,10	0,01	0,01

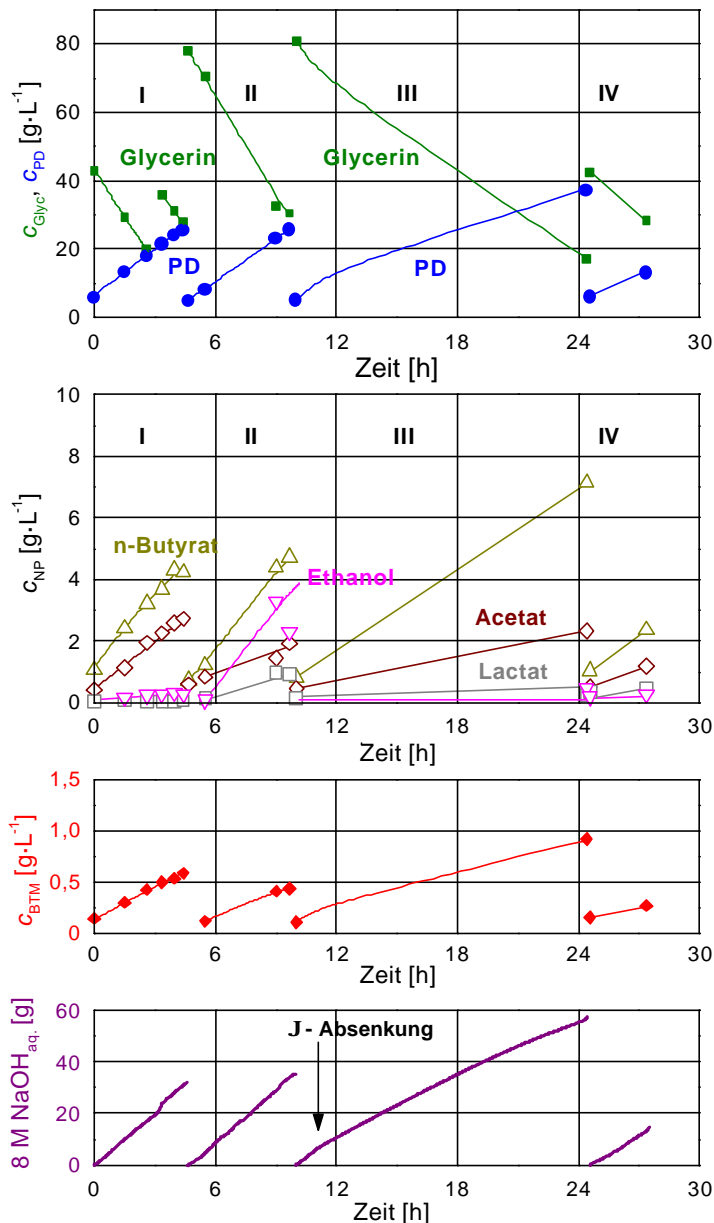


Abbildung 7-22: Sukzessive *batch*-Fermentation von *C. butyricum* immobilisiert in LentiKats®.

Die Abbildung zeigt die *batch*-Fermentation II, in der sehr wahrscheinlich eine Kontamination aufgetreten ist, was sich an der gegenüber *batch* I erheblich höheren Ethanolbildung äußert. *C. butyricum* NRRL B-1024 bildet Ethanol nur in sehr geringen Mengen. Die folgenden *batches* III und IV zeigen, dass die Kontamination sich nicht durchsetzen konnte, sondern dass praktisch das gleiche Nebenproduktspektrum gebildet wird wie zuvor. Den Einfluss der Kontamination auf die PD-Ausbeute in den *batches* spiegelt Tabelle 7-8 wider.

Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG, pH 7,5, $J = 38\text{ °C}$ (*batches* I, II, IV), Absenkung in *batch* III auf $J = 29\text{ °C}$, V_R 1000 mL $c_B \sim 100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Im Verlauf der durchgeführten *batch*-Fermentationen wurde häufiger eine stark erhöhte Ethanolbildung festgestellt. Es wurden Y_{EtOH} -Werte von bis zu 0,21 und damit stets einhergehend niedrige Werte für Y_{PD} von weniger als 0,45 ermittelt. Da die Ursache nicht mit einem anderen Parameter korreliert werden kann (pH-Wert, Temperatur, hohe c_{PD} im vorigen *batch*, o.ä.) ist wiederum das Auftreten von Kontaminationen wahrscheinlich. Diese konnte jedoch durch Austausch des Überstandes bei der Ernte entfernt werden. Die Immobilisierung schützt die Biomasse also vor dem Überwachsen durch Fremdkeime, kann jedoch – wie erwartet – nicht das Auftreten von Kontaminationen im Fermenter verhindern. Im Rahmen der durchgeführten kontinuierlichen Fermentationen wurden Möglichkeiten erprobt, auch ohne aufwändige Sterilisation des Kultivierungsmediums Kontaminationen zu vermeiden (vgl. 7.10.1).

7.10 Untersuchungen von LentiKats® in kontinuierlicher Fermentation

Die LentiKats® mit *C. butyricum* für die Experimente in kontinuierlicher Fermentation wurden auf die gleiche Weise hergestellt wie die Immobilisate für die *batch*-Fermentationen. Die standardi-

sierte Vorkultur wurde mit 20 % (v/v) eingesetzt (BAB etwa 10^8 Zellen \cdot mL⁻¹). Bei einer Überlebensrate der Zellen zwischen 10 und 50 % ergeben sich damit Immobilisate, deren Koloniedichte im optimalen Bereich liegt (vgl. 7.5 und Abbildung 7-23).

Es erfolgte wiederum eine Vorkultivierung in der AB. Die Dauer der Vorkultivierung betrug diesmal zwar aus technischen Gründen fast drei Tage, jedoch wurde der Immobilisatanteil c_B mit $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ niedriger gehalten als für die *batch*-Fermentationen. Abbildung 7-23 zeigt das Foto eines LentiKats[®] nach der Vorkultivierung in der AB für die kontinuierliche Fermentation, mit der die meisten Untersuchungen durchgeführt wurden.

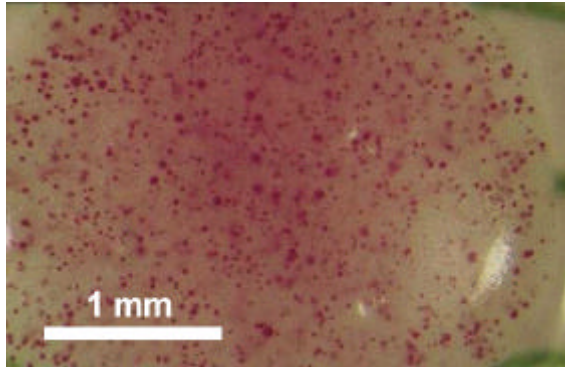


Abbildung 7-23: Mikroskopische Aufnahme eines LentiKats[®] mit *C. butyricum* aus der Vorkultivierung in der AB. Diese Immobilisate wurden anschließend für Untersuchungen in kontinuierlicher Fermentation eingesetzt. Der Vergleich mit Abbildung 7-12 zeigt, dass die Koloniedichte im optimalen Bereich liegt.

Die Kolonien sind noch klein, d.h. die Bedingungen während der Vorkultivierung in der Animpfflasche sind nicht optimal (Nährstoffversorgung, pH-Wert). Nach der ersten Anwuchsphase in der Animpfflasche in der AB wurden die Immobilisate in den Fermenter überführt und bei kontinuierlichem Betrieb kultiviert, um eine gute Nährstoffversorgung der Zellen und eine gute Koloniebildung zu erzielen. Alle kontinuierlichen Fermentationen der LentiKats[®] erfolgten in einem 500-mL-Reaktor. Es wurden damit kleinere V_R zwischen 200 und 500 mL eingestellt, um auch bei begrenzter Medienbereitstellung hohe Verdünnungsraten zu realisieren. Bei einer Immobilisatmenge von 40 g konnten c_B zwischen 80 und $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ untersucht werden.

Nach Änderung von Prozessparametern oder der Zusammensetzung des Mediums wurde bis zur Entnahme von Proben jeweils wenigstens vier bis fünf Verweilzeiten gewartet, um theoretisch den Reaktorinhalt einmal auszutauschen und so den neuen *steady state* ermitteln zu können. Wenn eine längerfristige Auswirkung auf die Biomasse erwartet oder gar beobachtet wurde, wurde länger gewartet, bis sich der *steady state* eingestellt hatte.

7.10.1 Sauerstofffreies Medium, online Medienbereitstellung, Sterilität

Auch bei dem verhältnismäßig kleinen Reaktorvolumen von 500 mL werden bei hohen Verdünnungsraten D von 1 bis 2 h^{-1} beachtliche Mengen benötigt. Die zunächst durchgeführte Versorgung durch einzeln hergestellte 10-L-Chargen, die durch Autoklavieren und nachfolgendes Abkühlen unter N_2 -Begasung sauerstofffrei gemacht wurden, erwies sich als zu aufwändig. Als Alternative wurde eine *online*-Medienbereitung installiert. Eine unsterile wässrige Lösung aller benötigten Nährsalze sowie unsteriles Glycerin wurden kontinuierlich in einem auf 5°C gekühlten Mischgefäß zusammengeführt, dort gerührt und mit N_2 begast. Die Kühlung sollte das Wachstum von Fremdkeimen verhindern. Nach definierter Verweilzeit wurde diese Mischung kontinuierlich in den Reaktor weitergepumpt und dem Reaktor die gewünschte Menge an konzentrierter, autoklavierter Hefeextraktlösung zudosiert – ebenfalls kontinuierlich. Typischerweise wurde im Mischgefäß eine Verweilzeit von 1 h eingestellt. Nach etwa einwöchigem Betrieb dieser Medienbereitung kam es im Mischgefäß trotz der Kühlung zu einer deutlich sichtbaren Bildung von Biomassebelägen an der Gefäßwandung - insbesondere oberhalb der Flüssigkeitsli-

nie. Gleichzeitig wurde auch im Fermenter Ethanolbildung festgestellt, welches als Indiz für das Auftreten von Fremdkeimen gewertet werden kann, wenngleich bei mikroskopischer Kontrolle keine Kontamination eindeutig nachgewiesen werden konnte. Durch vorübergehendes Erhöhen der Verdünnungsrate auf $0,9 \text{ h}^{-1}$ für einen Tag konnte die mögliche Kontaminante aus dem Reaktor ausgewaschen werden. Um das Zellwachstum im Mischgefäß dauerhaft einzudämmen, wurde eine Temperatur von 70 °C für die Medienbereitung eingestellt. Die potenziell temperaturempfindlichen Wuchsstoffe im Hefeextrakt sind davon nicht betroffen. Gleichzeitig wird durch die erhöhte Temperatur das Ausstrippen gelöster Gase und damit die Sauerstoffentfernung erleichtert.

Die im Bereich der Medienbereitstellung durchgeführten Untersuchungen können für die Konzeption eines biotechnischen Prozesses von Bedeutung sein, da sie zeigen, dass die aufwändige und kostspielige Sterilisation großer Mengen an Medium entfallen kann.

7.10.2 Einfluss der Temperatur auf *C. butyricum* NRRL B-1024 in LentiKats®

Die Temperatur wurde als elementarer Parameter biotechnischer Prozesse auch für die kontinuierliche Kultivierung immobilisierter Zellen untersucht. Der Einfluss niedriger Temperaturen auf die Aktivität der immobilisierten Biomasse war wegen der dort bestehenden Notwendigkeit zur Lagerung bereits in *batch*-Fermentationen untersucht worden (vgl. 7.9.2).

Nach grober Untersuchung eines Bereiches von 29 °C bis 44 °C , bei der lediglich die Entwicklung der Laugezugabe als Maß für die Aktivität herangezogen worden war, wurde der sich daraus ergebende interessante Bereich zwischen 37 °C und 40 °C näher betrachtet. Die gefundene Abhängigkeit der PD-Produktivität von der Kultivierungstemperatur zeigt Abbildung 7-24.

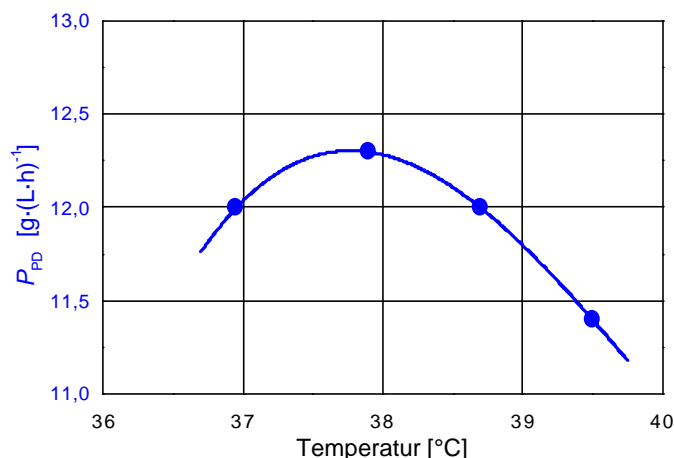


Abbildung 7-24: Temperaturoptimum von LentiKats® mit *C. butyricum* ermittelt bei kontinuierlicher Fermentation.

Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG⁴⁰, $D = 1,3 \text{ h}^{-1}$, $V_R = 300 \text{ mL}$, $c_{IB} = 150 \text{ g·L}^{-1}$, pH 7,0, ϑ variiert, $c_{HE} = 0 \text{ g·L}^{-1}$

Die trotz der hohen Immobilisationskonzentration im Vergleich zu den folgenden Experimenten (vgl. 7.10.4 und 7.10.5) geringen Absolutwerte für P_{PD} von etwa 12 g·(L·h)^{-1} beruhen darauf, dass zum einen noch keine Optimierung des pH-Wertes erfolgt war (vgl. 7.10.3) und zum anderen die Umsetzung *ohne* Hefeextraktzugabe erfolgte (vgl. 7.10.6). Die PD-Bildung mit immobilisierten Zellen von *C. butyricum* besitzt ein recht breites Temperaturoptimum: Bei je 1 K unterhalb bzw. oberhalb des Optimums von etwa 38 °C liegt die Produktivität weniger als 5 % niedriger. Das ermittelte Optimum liegt geringfügig oberhalb dem für *C. butyricum* NRRL B-1024 (ATCC 859) angegebenen Optimum von 37 °C . Für die nachfolgenden Versuche wurde eine Kultivierungstemperatur von 38 °C gewählt. Die nachfolgende Tabelle 7-9 zeigt die Daten aus dem Versuch

zum Temperaturoptimum. Es ist kein signifikanter Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Produktverteilung und damit die Ausbeuten festzustellen.

Tabelle 7-9: Einfluss der Temperatur auf die PD-Bildung von LentiKats® mit *C. butyricum* in kontinuierlicher Fermentation. Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG⁴⁰, $D = 1,3 \text{ h}^{-1}$, $V_R = 310 \text{ mL}$, $c_{IB} = 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,0, ϑ variiert, $c_{HE} = 0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Temperatur [°C]	37,0	37,9	38,7	39,5
c_{Glyc} im Zulauf [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	41,0	41,0	41,0	41,0
c_{Glyc} im Ablauf [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	20,8	20,6	21,0	22,9
Glycerin umgesetzt [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	20,3	20,5	20,1	18,2
Glycerin umgesetzt [%]	49,5	50,0	49,0	44,4
c_{HE} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,0	0,0	0,0	0,0
c_{BTM} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,35	0,32	0,34	0,24
P_{BTM} [$\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$]	0,46	0,42	0,44	0,31
c_{PD} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	9,8	9,8	9,6	9,1
P_{PD} [$\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$]	12,0	12,3	12,0	11,4
Y_{PD} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,59	0,58	0,58	0,60
Y_{But} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,08	0,08	0,08	0,09
Y_{Ac} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,07	0,06	0,07	0,06
Y_{Lac} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,00	0,00	0,00	0,00
Y_{EtOH} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,01	0,00	0,00	0,01

7.10.3 Einfluss des pH-Wertes auf *C. butyricum* NRRL B-1024 in LentiKats®

Neben der Temperatur spielt auch der pH-Wert eine entscheidende Rolle bei biotechnischen Prozessen. Insbesondere wenn bei Kultivierung immobilisierter Biokatalysatoren auch Säuren gebildet werden, ist der optimale Wert für den pH-Wert stark von der Aktivität der Biomasse abhängig. Es können sich mehr oder weniger steile pH-Wert-Gradienten ausbilden, die inhibierend wirken können.

Bei den Untersuchungen zum pH-Optimum von LentiKats® mit *C. butyricum* in kontinuierlicher Fermentation ergab sich der in Abbildung 7-25 dargestellte Verlauf.

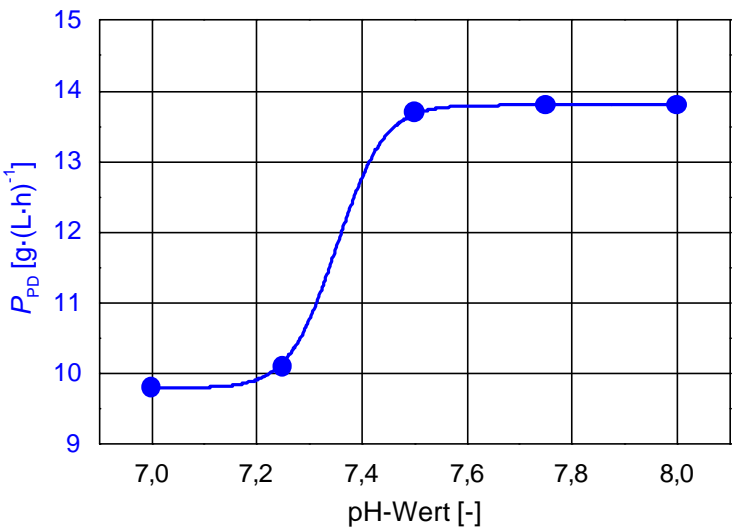


Abbildung 7-25: pH-Wert-Optimum von LentiKats® mit *C. butyricum* ermittelt bei kontinuierlicher Fermentation.

Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG⁴⁰, $D = 0,9 \text{ h}^{-1}$, $V_R = 400 \text{ mL}$, $c_{IB} = 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH variiert, $\vartheta = 38 \text{ °C}$, $c_{HE} = 0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Bei den Versuchen zum pH-Wert-Optimum wurde jeweils ein Wert eingestellt und bis zur Gleichgewichtseinstellung gewartet. Während des leichten Anstieges der Produktivität bei der Änderung von pH 7,0 auf knapp 7,3 stellte sich eine konstante Laugezugabe nach wenigen Verweilzeiten ein. Bei anschließender Erhöhung des pH-Wertes auf 7,5 zeigte sich ein deutlicher Produktivitätsanstieg, der jedoch nicht sprunghaft, sondern über einen Zeitraum von drei Tagen erfolgte. Zur Verdeutlichung ist die Entwicklung der zugegebenen Laugemenge je Stunde während der Versuche zum pH-Wert-Optimum in Abbildung 7-26 dargestellt. Die Laugezugabe soll hier als Maß für die Aktivität der Zellen angesehen werden.

Man erkennt deutlich den allmählichen Aktivitätsanstieg über mehrere Tage nach Einstellung eines pH-Werts von 7,5. Dieser langsame Anstieg der Aktivität kann nicht mit physikalischen Phänomenen allein erklärt werden, sondern er dürfte auf zusätzlichem Wachstum der Zellen im Gel beruhen. Nach der grau unterlegten, detaillierteren Darstellung in Abbildung 7-26 ist nicht auszuschließen, dass auch bei pH-Werten von 7,3 oder sogar 7,0 noch ein Aktivitätszuwachs erfolgt wäre. Daher können eventuell die entsprechenden Produktivitätswerte in Abbildung 7-25 noch etwas höher liegen und es ergäbe sich ein weniger sprunghafter Verlauf. Es ändert sich jedoch nichts an der Aussage, dass ein höherer pH-Wert zwischen 7,5 und 8,0 offenbar für die Umsetzung günstiger ist. Für die nachfolgenden Experimente wurde ein pH-Wert von 7,8 gewählt. Die Daten der Experimente zur pH-Wert-Optimierung sind in Tabelle 7-10 dargestellt.

Die Daten für die Ausbeuten der verschiedenen Produkte zeigen keinen eindeutigen Trend zur gezielten Beeinflussung der PD-Ausbeute. Der Vergleich mit den Daten aus der Optimierung der Kultivierungstemperatur legt die Vermutung nahe, dass es sich bei $Y_{PD} = 0,62$ für einen pH-Wert von 7,0 um einen Ausreißer handelt. Bei einem tatsächlich geringeren Wert von etwa 0,58 ergäbe sich aus der Tabelle ein Trend in Richtung höherer PD-Ausbeuten für höhere pH-Werte.

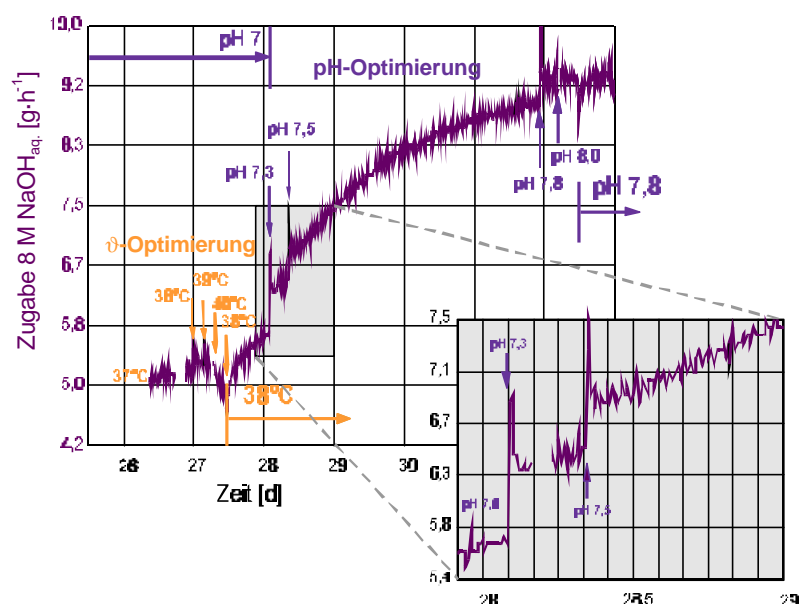


Abbildung 7-26: Zeitliche Entwicklung der Laugezugabe pro Zeit während der Versuche zum Temperatur- und pH-Optimum von *C. butyricum* in LentiKats®.

Die Ursache für die höhere Produktivität bei einem höheren pH-Wert liegt wahrscheinlich in einem verschobenen pH-Wert-Gradienten in den LentiKats® begründet. Die Biomasse im Hydrogel produziert als Nebenprodukt organische Säuren, die den pH-Wert senken. Der Transport der Säure aus dem Inneren der Gel-Linsen zur Oberfläche erfolgt durch Diffusion.

Die Folge ist die Ausbildung eines pH-Wert-Gradienten. Je langsamer die Diffusion und je aktiver die Biomasse desto ausgeprägter, d.h. steiler ist der Gradient.

Tabelle 7-10: Optimierung des pH-Wertes für die PD-Bildung durch LentiKats® mit *C. butyricum* in kontinuierlicher Fermentation. Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG⁴⁰, $D = 0,9 \text{ h}^{-1}$, $V_R = 400 \text{ mL}$, $c_B = 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH variiert, $\vartheta = 38 \text{ °C}$, $c_{HE} = 0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

pH-Wert [-]	7,0	7,3	7,5	7,8	8,0
c_{Glyc} im Zulauf [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	41,5	41,5	41,5	41,7	41,7
c_{Glyc} im Ablauf [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	20,3	18,3	11,4	11,8	12,6
Glycerin umgesetzt [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	21,2	23,2	30,1	29,9	29,1
Glycerin umgesetzt [%]	51,1	55,9	72,5	71,7	69,8
c_{HE} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
c_{BTM} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,31	0,31	0,51	0,42	0,32
P_{BTM} [$\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$]	0,28	0,28	0,46	0,38	0,29
c_{PD} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	10,9	11,2	15,2	15,4	15,3
P_{PD} [$\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$]	9,8	10,1	13,7	13,8	13,8
Y_{PD} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,62	0,58	0,61	0,62	0,63
Y_{But} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,10	0,09	0,11	0,11	0,11
Y_{Ac} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05
Y_{Lac} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
Y_{EtOH} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02

Bei Erhöhung des pH-Wertes außerhalb der Immobilisate wird möglicherweise der Gradient verschoben, d.h. der pH-Wert steigt insgesamt an, zumindest jedoch wird der Abtransport der Säuremoleküle beschleunigt. Als Folge davon erhöht sich der pH-Wert im Inneren der LentiKats®, also in der direkten Umgebung der Biomasse, was zu geringerer Hemmung führen sollte. Neben eine Aktivitätssteigerung der vorhandenen Biomasse ist auch denkbar, dass sich mehr Biomasse im zentralen Bereich der Gel-Linsen bilden kann.

Das verwendete Mineralsalzmedium ist mit Phosphat gepuffert. Eine Erhöhung der Phosphatkonzentration kann nur kurzzeitig den optimalen pH-Wert auch im Inneren der Gel-Linsen aufrechterhalten. Anschließend wird auch das „verbrauchte“, protonierte Phosphat nach Diffusion durch das Gel regeneriert. Eine Erhöhung der Phosphatkonzentration von 10 auf 100 mM zur Untersuchung eines möglichen positiven Einflusses einer besseren Pufferung führte zu einer erheblichen Hemmung der PD-Bildung (vgl. Abbildung 7-31).

7.10.4 Glycerinlimitierung und –inhibierung

Die Versorgung des Biokatalysators mit Glycerin ist von zentraler Bedeutung für die erreichbare Aktivität. Wie schon bei den *batch*-Fermentationen mit freien und immobilisierten Zellen wurden auch in kontinuierlicher Kultur Versuche zum Einfluss der Glycerinkonzentration auf die PD-Bildung durchgeführt. Es wurden bei hoher Verdünnungsrate von $D = 2,3 \text{ h}^{-1}$ verschiedene Glycerinkonzentrationen im Zulauf eingestellt, um diese *im* Fermenter zu variieren. Abbildung 7-27 zeigt den Verlauf der Produktivität in Abhängigkeit der eingestellten c_{Glyc} im Ablauf.

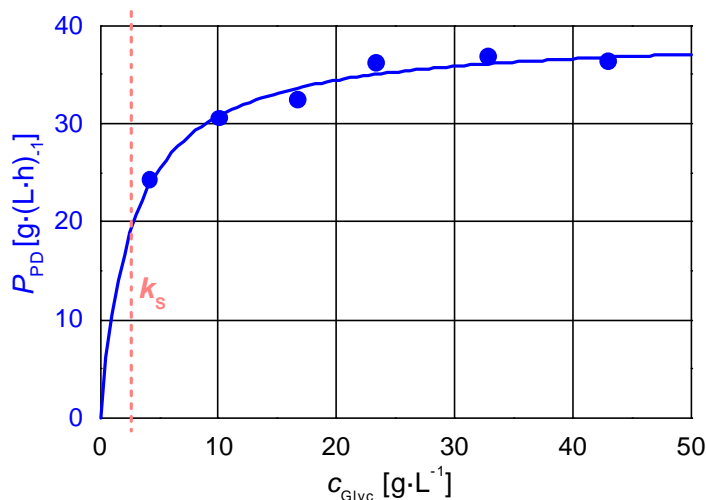


Abbildung 7-27: Einfluss der Glycerinkonzentration auf die PD-Produktivität von LentiKats® mit *C. butyricum* in kontinuierlicher Fermentation.

Bei Ansatz der Michaelis-Menten-Kinetik ergeben sich die angegebenen Werte für die maximale Produktivität $P_{PD,max} = 39,1 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ und $k_S = 2,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG, $D = 2,3 \text{ h}^{-1}$, $V_R = 200 \text{ mL}$, $c_{IB} = 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,8, $\vartheta = 38 \text{ }^\circ\text{C}$

Die PD-Produktivität ist oberhalb einer c_{Glyc} von etwa $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ praktisch auf sehr hohem Niveau stabil. Unterhalb sinkt sie mit der Glycerinkonzentration rasch ab. Bei Ansatz der Michaelis-Menten-Kinetik, also unter Vernachlässigung einer Substratinhibierung, ergibt sich $P_{PD,max}$ zu $39,1 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ und k_S zu $2,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Der maximale Wert für die PD-Produktivität ist eher theoretischer Natur, da nach aller Voraussicht die für das annähernde Erreichen notwendige Glycerinkonzentration inhibierend sein würde. Der k_S -Wert liegt zwar etwas niedriger als der im *batch* bestimmte Wert (vgl. 7.9.4), bestätigt aber die dort gefundenen relativ hohen Werte für die Immobilisate. Augenfällig ist der starke Rückgang der Produktivität bei einer Glycerinkonzentration unterhalb von $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Dieselbe Beobachtung machten REIMANN *et al.* mit quasi-immobilisierten Zellen in einer kontinuierlichen Fermentation von suspendierten Zellen von *Clostridium butyricum* DSM 5431 in einem Reaktorsystem mit Zellrückhaltung (REIMANN A *et al.* 1998b). Die Abbildung zeigt auch, dass bis zu einer Ablaufkonzentrationen von 40 bis $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glycerin keine signifikante Inhibierung durch das Substrat zu erkennen ist.

Die nachfolgende Tabelle 7-11 gibt die Daten aus dem durchgeführten Experiment im Detail.

Tabelle 7-11: Einfluss der Glycerinkonzentration auf die PD-Produktivität von LentiKats® mit *C. butyricum* in kontinuierlicher Fermentation. Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG, $D = 2,3 \text{ h}^{-1}$, $V_R = 200 \text{ mL}$, $c_{IB} = 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,8, $\vartheta = 38 \text{ }^\circ\text{C}$

c_{Glyc} im Reaktor [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	4,3	10,1	16,8	23,4	32,9	43,1
c_{Glyc} im Zulauf [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	26,1	38,1	47,1	56,4	68,0	78,0
(c_{Glyc} im Ablauf [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$])	(4,3)	(10,1)	(16,8)	(23,4)	(32,9)	(43,1)
Glycerin umgesetzt [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	21,9	28,0	30,3	32,9	35,2	34,9
Glycerin umgesetzt [%]	83,9	73,5	64,3	58,3	51,8	44,7
c_{HE} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0
c_{BTM} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	0,79	0,80	0,73	0,79	0,73	0,66
P_{BTM} [$\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$]	1,82	1,84	1,68	1,82	1,68	1,52
c_{PD} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	10,8	13,6	14,4	16,1	16,4	16,1
P_{PD} [$\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$]	23,6	29,6	31,7	35,3	36,4	36,3
Y_{PD} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,60	0,59	0,57	0,59	0,56	0,56
Y_{But} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,07	0,06	0,06	0,05	0,04	0,04
Y_{Ac} [$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$]	0,05	0,06	0,06	0,07	0,07	0,08

Y_{Lac} [mol · mol ⁻¹]	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Y_{EtOH} [mol · mol ⁻¹]	0,11	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05

Die Tabelle zeigt deutlich, wie bei suboptimaler Glycerinversorgung und gleicher Verdünnungsrate die Produktivität und die c_{PD} sinken. Die Höhe des Glycerinüberschusses hat zudem einen sichtbaren Einfluss auf die Produktverteilung bei der Umsetzung. In Übereinstimmung mit ZENG wird bei Substratüberschuss höhere Acetat- und geringere Butyratbildung beobachtet als bei Substratlimitierung. Die ermittelten Werte für die PD-Bildung widersprechen jedoch der Theorie, die für hohe Butyrat- und niedrige Acetatbildung eine schlechte PD-Ausbeute erwarten lassen (ZENG 1996).

7.10.5 Einfluss der Verdünnungsrate

Zur Auslegung eines Prozesses sind Untersuchungen zur erreichbaren PD-Produktivität und -Konzentration von zentraler Bedeutung. Um die Untersuchungen zur Verweilzeit weitgehend unabhängig von der Nährstoffversorgung der Zellen untersuchen zu können, wurde die Zugabe von Hefeextrakt jeweils so eingestellt, dass unabhängig von der Verweilzeit des Mediums je Stunde 0,5 g HE zugegeben wurden. So sollte die gleichbleibende Menge an Biomasse im Reaktor möglichst vergleichbar mit diesen Wuchsstoffen versorgt werden. Eine konstante c_{HE} im Medium hätte hingegen die Versuche mit großer Verdünnungsrate übermäßig bevorzugt. Der Verlauf der Produktivität und der Konzentrationen von Glycerin und PD ist in Abbildung 7-28 gezeigt.

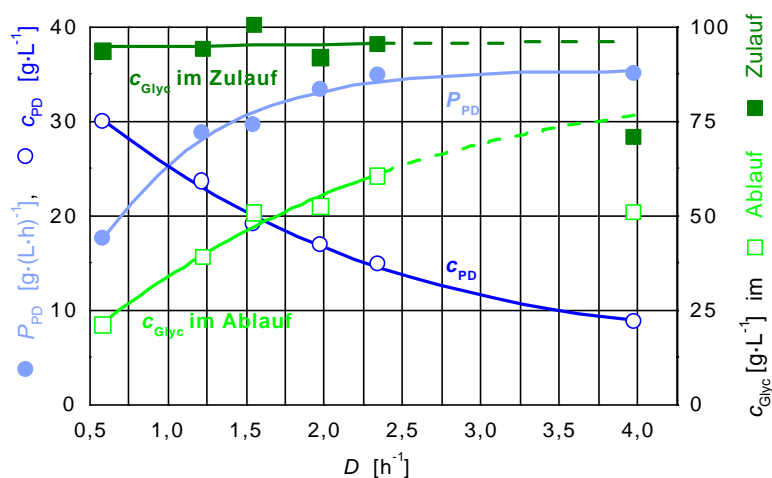


Abbildung 7-28: Kontinuierliche Fermentation von Lenti-Kats® mit *C. butyricum*. Verlauf der PD-Produktivität sowie der Konzentrationen von PD und Glycerin bei Variation der Verdünnungsrate D .

Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG, D variiert, $V_R = 200$ mL, $c_{\text{IB}} = 200$ g · L⁻¹, pH 7,8, $\vartheta = 38$ °C, c_{Glyc} im Zulauf etwa 90 g · L⁻¹, Zugabe von 0,5 g HE je Stunde

Im Hinblick auf eine spätere Nutzung von niedrig konzentrierten Rohglycerinwässern wurde das gezeigte Experiment bei einer Zulaufkonzentration von 90 g · L⁻¹ Glycerin durchgeführt.

Die Ursache für die nicht konstante Glycerinkonzentration im Zulauf liegt im Einsatz der automatischen Medienbereitung begründet, bei der die einzelnen Volumenströme jeweils neu eingestellt werden mussten. Insbesondere die Glycerinwerte bei $D = 4,0$ h⁻¹ weichen aufgrund wiederholter Einstellungsschwierigkeiten und Kapazitätsproblemen der verwendeten Pumpen erheblich vom gestrichelt angegebenen idealen Verlauf ab. Auf Basis der Versuche zum Einfluss der Glycerinkonzentrationen (Abbildung 7-27) kann man jedoch vermuten, dass die erzielte Glycerinkonzentration von etwa 50 g · L⁻¹ im Vergleich zu den erwarteten 75 g · L⁻¹ keine Substratlimitierung bewirkt hat.

Wird eine kleine Verdünnungsrate unterhalb von etwa $1,5 \text{ h}^{-1}$ gewählt, können hemmende und limitierende Faktoren nicht vernachlässigt werden. Die Konzentration von Haupt- und Nebenprodukten ist hoch, was sich negativ auf die PD-Bildung auswirkt. Gleichzeitig stehen durch den geringeren Durchfluss weniger Nährsalze und Spurenelemente je Zeiteinheit zur Verfügung, was limitierend sein kann.

Für hohe Verdünnungsraten oberhalb von etwa $2,0 \text{ h}^{-1}$ ist die Produktivität dagegen praktisch konstant und c_{PD} steigt linear mit sinkender Verdünnungsrate. Bei hoher Verdünnungsrate liegen hemmende Substanzen in nur kleiner Konzentration vor, die Versorgung mit eventuell limitierenden Komponenten ist dagegen optimal. Die Produktivität nähert sich für hohe Verdünnungsraten asymptotisch $P_{PD,max}$. Dieser Wert beschreibt die größte Produktivität, die mit *C. butyricum* NRRL B-1024 unter den vorliegenden Bedingungen etwa von Fermentersystem, Prozessbedingungen, Immobilisatmenge und -besiedlung erreichbar ist. Halbiert man die Verdünnungsrate von 4 auf 2 h^{-1} , so verdoppelt sich c_{PD} nahezu. Halbiert man sie jedoch wiederum von 2 auf 1 h^{-1} wird die Limitierung bzw. Inhibierung deutlich: Hier steigt c_{PD} nur etwa von 17 auf $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, also nur um knapp 50 %. Da nach Abbildung 7-27 eine Glycerinlimitierung erst unterhalb von 10 bis $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ deutlich zu Tage tritt, müssen in erster Linie andere Effekte für diese Produktivitätseinbußen bei großen Verweilzeiten verantwortlich sein, beispielsweise wie erwähnt eine Inhibierung durch PD und Nebenprodukte.

Die nachfolgende Tabelle 7-12 gibt die Daten aus dem Experiment zur Verdünnungsrate.

Tabelle 7-12: Einfluss der Verdünnungsrate auf die PD-Bildung von LentiKats® mit *C. butyricum* in kontinuierlicher Fermentation. Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG, D variiert, $V_R = 200 \text{ mL}$, $c_{IB} = 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,8, $\vartheta = 38 \text{ }^\circ\text{C}$, c_{Glyc} im Zulauf etwa $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, Zugabe von 0,5 g HE je Stunde

$D \text{ [h}^{-1}\text{]}$	0,6	1,2	1,6	2,0	2,3	4,0
c_{Glyc} im Zulauf $[\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$	93,4	94,1	100,1	91,7	95,6	71,0
c_{Glyc} im Ablauf $[\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$	19,7	39,4	55,8	53,6	60,5	51,0
Glycerin umgesetzt $[\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$	73,7	54,8	44,3	38,1	35,0	20,0
Glycerin umgesetzt [%]	78,9	58,2	44,3	41,5	36,6	28,2
$c_{HE} \text{ [g} \cdot \text{L}^{-1}\text{]}$	4,0	1,9	1,5	1,2	1,0	0,6
$c_{BTM} \text{ [g} \cdot \text{L}^{-1}\text{]}$	1,02	0,75	0,61	0,62	0,63	0,41
$P_{BTM} \text{ [g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}\text{]}$	0,60	0,92	0,95	1,23	1,47	1,63
$c_{PD} \text{ [g} \cdot \text{L}^{-1}\text{]}$	30,0	23,7	19,4	17,1	14,9	8,8
$P_{PD} \text{ [g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}\text{]}$	17,6	28,9	30,0	33,8	35,0	34,9
$Y_{PD} \text{ [mol} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$	0,49	0,52	0,53	0,54	0,52	0,53
$Y_{But} \text{ [mol} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03
$Y_{Ac} \text{ [mol} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$	0,05	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08
$Y_{Lac} \text{ [mol} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$	0,05	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02
$Y_{EtOH} \text{ [mol} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}$	0,09	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06

Die für verschiedene Verdünnungsraten bestimmten PD-Ausbeuten, liegen unterhalb derer aus Tabelle 7-11 – insbesondere diejenige für $D = 0,6 \text{ h}^{-1}$. Dies ist erstaunlich, da insgesamt keine deutlichen Unterschiede in der Bildung der Nebenprodukte beobachtet wurden und zudem die Biomassebildung deutlich geringer ist. Eine Erklärung für die sehr niedrige PD-Ausbeute von 0,49 bei $D = 0,6 \text{ h}^{-1}$ liegt eventuell in der Hefeextraktzugabe, da die durchgeführte zeitlich konstante Zudosage zu einer sehr hohen effektiven c_{HE} im Medium führt. Die mögliche Wirkungsweise ist jedoch unklar.

Abbildung 7-28 verdeutlicht den vorliegenden Widerspruch zwischen extrem hoher PD-Produktivität und gleichzeitig hoher PD-Konzentration. Es muss also ein Kompromiss gefunden werden. Bei einer Verdünnungsrate von etwa 1,3 bis 1,5 h⁻¹ werden hohe P_{PD} im Bereich von etwa 30 g · (L · h)⁻¹ erzielt, gleichzeitig beträgt die erreichte c_{PD} deutlich mehr als 20 g · L⁻¹. Will man durch niedrige D in einem Schritt, also in einer Stufe, zu höheren Produktkonzentrationen gelangen, so geht dies zu Lasten der Produktivität. Die Nutzung einer mehrstufigen Umsetzung in einer Rührkesselkaskade hingegen erlaubt es, einen großen Teil der Umsetzung bei noch moderater Produktkonzentration und somit sehr hoher Produktivität durchzuführen. In sich anschließenden Stufen wird bei geringerer Produktivität die c_{PD} erhöht. Neben kontinuierlicher Kultivierung ist hierfür auch eine Fermentation im *batch*-Betrieb denkbar, die bei Produktinhibierung natürlich besser geeignet ist. Ein mehrstufiger Prozess erlaubt zudem die Einstellung unterschiedlicher Parameter, wie z.B. Temperatur oder pH-Wert, für die verschiedenen Phasen der Umsetzung sowie die Zudosierung von Nährstoffen.

7.10.6 Limitierung durch Nährstoffe – Einfluss von Hefeextrakt

Die Experimente zum Einfluss der Verdünnungsrate machen das Vorliegen einer Limitierung der Biomasse wahrscheinlich, da bei Vervierfachung der Verdünnungsrate von 1 auf 4 h⁻¹ die PD-Produktivität erheblich ansteigt (vgl. Abbildung 7-28). Neben einer Limitierung durch einen im zulaufenden Medium zu wenig enthaltenen Stoff ist jedoch auch eine Inhibierung der Zellen durch eines der Reaktionsprodukte möglich.

Es wurde getestet, inwieweit der Mangel an verschiedenen Nährsalzen limitierend für die PD-Bildung durch die immobilisierten Clostridien in kontinuierlicher Kultur ist. Dazu wurde bei ansonsten konstanten Bedingungen über eine Pumpe eine konzentrierte Lösung je eines Nährsalzes so zudosiert, dass seine Konzentration im Medium allmählich verdoppelt wurde (*shift*-Experiment). Diese Zudosierung wurde für wenigstens vier Verweilzeiten aufrechterhalten, um die gewünschte Verdopplung der Nährsalzkonzentration und eine mögliche Wirkung auf die Zellen abzuwarten. Die zugegebene Laugemenge je Zeiteinheit wurde als Parameter für die Bewertung eines Einflusses durch das jeweilige Nährsalz herangezogen. Mit dieser Vorgehensweise wurden CoCl₂ · 6 H₂O, FeCl₃ · 4 H₂O, MgSO₄ · 7 H₂O, ZnCl₂ sowie CaCl₂ · 2 H₂O untersucht, daneben KH₂PO₄ und Na₂SO₄. Für keine der untersuchten Substanzen konnte auf diese Weise ein positiver Effekt auf die PD-Bildung festgestellt werden. Im Gegenteil hatten erhöhte Konzentrationen von Zinkchlorid, Natriumsulfat und Kaliumdihydrogenphosphat eine eher hemmende Wirkung.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass keines der untersuchten Nährsalze in deutlich zu geringer Menge verfügbar ist – zumindest nicht als einzige Mangelkomponente. Eher unwahrscheinlich ist, dass gleich zwei Substanzen in gleichem Umfang limitierend wirken.

Beim Wechsel auf eine frische Charge Rohglycerin, ebenfalls aus der Biodiesel-Anlage der Oelmühle Connemann, zeigten sich erneut Anzeichen für eine mögliche Nährstofflimitierung der Zellen (Abbildung 7-29).

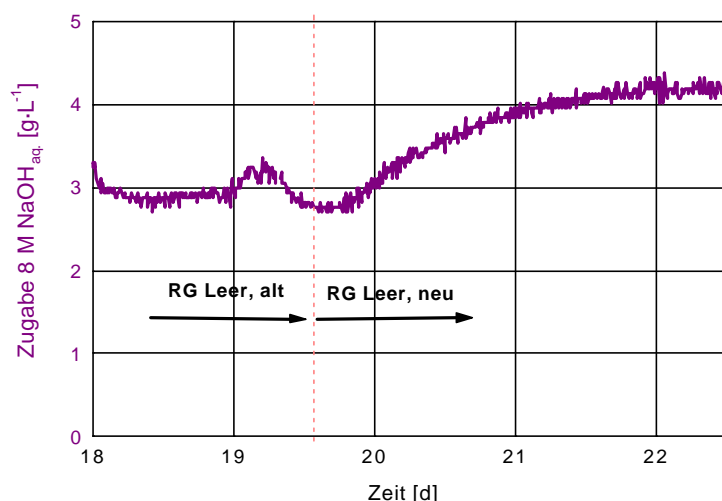


Abbildung 7-29: Zeitliche Entwicklung der Laugezugabe pro Zeit während der Umstellung von altem Rohglycerin (RG) auf eine neue Charge derselben Anlage in Leer. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt des Wechsels. Das alte RG war etwa zwei Jahre bei Raumtemperatur gelagert, das neue hingegen nur wenige Wochen.

Der vorübergehende Anstieg der Laugezugabe zu Beginn von Tag 19 beruht auf einer kurzzeitigen Verdopplung von D .

Medium: $\text{MinS}^{10}\text{N}^{100}\text{RG}^{50}$, $D = 0,6 \text{ h}^{-1}$, $V_R = 300 \text{ mL}$, $c_{\text{IB}} = 150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,0, $\vartheta = 37 \text{ }^\circ\text{C}$

Offensichtlich ist in der neuen Charge des Rohglycerins aus Leer eine erhöhte Konzentration derjenigen Stoffe vorhanden, die die Aktivität der Clostridien fördern. Es sind zwei grundsätzlich verschiedene Änderungen in der Zusammensetzung des Rohglycerins möglich: zum einen unterschiedliche Konzentrationen der Nährsalze, sprich der *Anorganik*, zum anderen eine geänderte Zusammensetzung komplexer Komponenten, wie etwa Vitaminen und anderen Wachstumsstoffen, sprich *Organik*.

Die Konzentration verschiedener Ionen in den beiden Rohglycerinchargen wurde untersucht. Tabelle 7-13 zeigt den Vergleich.

Tabelle 7-13: Vergleich der Konzentrationen unterschiedlicher Metallionen in zwei verschiedenen RG-Chargen A und B aus der RME-Anlage der Oelmühle Connemann in Leer. Alle Angaben in ppm (mg je kg).

Element	Rohglycerin aus Leer		Faktor
	Charge, alt	Charge, neu	(alt / neu)
Al	1,0	0,7	$1,4 \times$
B	0,9	3,3	$0,3 \times$
Ca	64	71	$0,9 \times$
Cd	0,005	0,004	$1,3 \times$
Cr	0,06	0,13	$0,5 \times$
Cu	1,0	1,7	$0,6 \times$
Fe	1,9	3,1	$0,6 \times$
Ni	0,8	2,8	$0,3 \times$
Mg	15,6	12,7	$1,2 \times$
Mn	0,10	0,13	$0,8 \times$
Mo	0,04	0,2	$0,2 \times$
Pb	0,02	0,01	$2,0 \times$
Zn	0,3	0,4	$0,8 \times$

Die Konzentrationen der einzelnen Metallionen sind weitgehend vergleichbar, d.h. es war in der neuen Glycerincharge keines der untersuchten Nährsalze in einer signifikant höheren Konzentration vorhanden, die eine Limitierung durch diese Komponente vermuten lässt.

Ein weiterer Grund für die positive Wirkung der frischen Rohglycerincharge kann in einer geänderten Zusammensetzung der vorhandenen Vitamine und Wuchsstoffe liegen. Es ist denkbar, dass in der zwei Jahre alten Charge diese ehemals vorhandenen organischen Bestandteile über die Dauer der Lagerung abgebaut wurden oder sie ihre Wirkung verloren haben. So könnte selbst bei weitgehend konstanter Zusammensetzung des Rohglycerins unmittelbar nach der Produktion der Gehalt der beiden Chargen an biologisch förderlichen Komponenten zum Zeitpunkt der Experimente deutlich abweichend gewesen sein.

Die positive Wirkung komplexer Bestandteile zeigte sich in einem Experiment, in dem die Konzentration von Hefeextrakt variiert wurde, der eine Reihe von Vitaminen und Wuchsstoffen enthält. Abbildung 7-30 verdeutlicht den Einfluss des komplexen Zusatzstoffes.

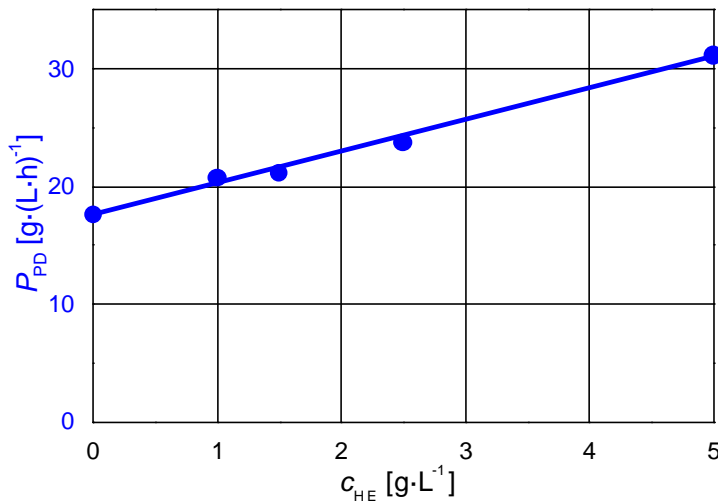


Abbildung 7-30: Einfluss der Hefeextraktkonzentration auf die PD-Produktivität von LentiKats® mit *C. butyricum* in kontinuierlicher Fermentation. Es wurde versucht, die Glycerinkonzentration so einzustellen, dass die Konzentration im Reaktor vergleichbar war.

Medium: MinS¹⁰N¹⁰⁰RG, c_{Glyc} variiert, $D = 1,2 h^{-1}$, $V_R = 200 mL$, $c_{IB} = 200 g \cdot L^{-1}$, pH 7,8, $\vartheta = 38 ^\circ C$

Es wird deutlich, wie höhere Konzentrationen an HE die PD-Bildung fördern. Es ist also gut vorstellbar, dass eine erhöhte Konzentration an Wuchsstoffen in der neueren Rohglycerincharge für deren positive Wirkung verantwortlich ist.

Abbildung 7-30 zeigt gleichzeitig, dass auch ganz ohne Hefeextrakt die PD-Bildung durch *C. butyricum* möglich ist. Dies war beispielsweise bei allen untersuchten thermophilen Stämmen nicht möglich. Eine kontinuierliche Fermentation von *C. butyricum* in LentiKats® wurde hingegen problemlos mehrere Wochen ohne jegliche Zugabe von HE durchgeführt. Die Untersuchungen zu pH-Wert und Temperatur-Optimierung wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt (vgl. 7.10.2 und 0).

Bei höherer Hefeextraktzugabe konnten in kontinuierlicher Fermentation deutlich mehr freie Zellen wachsen. Ohne Hefeextrakt im Medium betrug die BTM-Konzentration im Reaktor etwa $0,5 g \cdot L^{-1}$, bei $5 g \cdot L^{-1}$ HE lag die c_{BTM} etwa doppelt so hoch. Bei einem BTM-Gehalt von geschätzten $20 g \cdot L^{-1}$ durch die immobilisierte Biomasse ist dies jedoch vernachlässigbar.

Der biotechnische Prozess zur Herstellung von PD soll einfach und preiswert sein, daher erscheint die Zugabe von Hefeextrakt unangebracht. Es ist jedoch möglich, dass nur ein Wuchsstoff oder nur wenige komplexe Komponenten aus dem Hefeextrakt wichtig für die PD-Bildung sind. Wenn gezielt Vitamine und Wuchsstoffe auf ihre Wirkung hin überprüft werden, könnten bei positivem Resultat eventuell preiswertere Quellen für diese Substanzen eingesetzt werden, z.B. Melasse, Maisquellwasser oder gar Klärschlamm.

7.10.7 Einsatz von Rohglycerinwasser

Um zur chemischen Synthese von PD konkurrenzfähig zu sein, müssen möglichst kostengünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Der Einsatz von nicht aufkonzentrierten Rohglycerinwässern ist unter diesem Aspekt wünschenswert. Um die Eignung solcher Substrate zu überprüfen, wurden sie in kontinuierlicher Fermentation vorübergehend eingesetzt.

Ein erheblich verunreinigtes, trübes Rohglycerinwasser aus einer Fettspaltungsanlage der Prignitzer Chemie Werke in Wittenberge mit einem Glyceringehalt von etwa 9 % (w/v) wurde zunächst *direkt* als Zulaufmedium eingesetzt. Daraufhin kam es zu einem deutlichen Absinken der Laugezugabe und damit der Aktivität der Biomasse. Um diesen Aktivitätsabfall zu stoppen und eine eventuelle Schädigung der Zellen durch Nährstoffmangel zu verhindern, wurden dem zulaufenden Rohglycerinwasser die gleichen Nährsalze in der gleichen Konzentration zugesetzt, wie sie im sonst verwendeten Mineralsalzmedium vorliegen. Daraufhin pendelte sich die PD-Bildung auf einem konstanten Niveau ein, und die P_{PD} betrug mit $16,8 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ etwa 60 % des Wertes, der vorher mit Mineralsalzmedium und dem üblichen teilkonzentrierten RG aus der Biodieselherstellung erreicht worden war. Nach Rückkehr zu eben diesem Medium wurde wieder die gleiche Produktivität erreicht, wie vor Nutzung des Rohglycerinwassers. Dies zeigt, dass das stark verunreinigte Substrat die Zellen keinesfalls geschädigt hat.

7.10.8 Langzeitstabilität und –aktivität

Bei der Entwicklung jedes technischen Prozesses, der Biokatalysatoren für die Umsetzung nutzt, sind Stabilität und Langzeitaktivität dieses Katalysators äußerst wichtig. Dabei stehen gleichermaßen die mechanische Stabilität und geringe Aktivitätsverluste beim Einsatz als auch eine gute Regenerierbarkeit des Katalysators im Vordergrund.

Die Biokonversion von Glycerin zu PD mit in LentiKats[®] immobilisierten Zellen hat sich in diesem Sinne als stabiler Prozess erwiesen. Die mechanische Stabilität der Immobilisate ist exzellent – die Gel-Linsen schützen die eingeschlossenen Clostridien zudem wirkungsvoll vor schädigenden Einflüssen und kurzzeitigen Betriebsschwankungen. Die Bakterien sind in den LentiKats[®] in Form von Kolonien eingeschlossen. Dies bedeutet, dass je Kolonie im Falle zellschädigender Bedingungen theoretisch nur *eine* teilungsfähige Zelle überleben muss, damit der Biokatalysator nach erneuter Anwachsphase seine ursprüngliche Aktivität wiedererlangen kann.

Abbildung 7-31 zeigt die Entwicklung der spezifischen Aktivität A_{PD} der LentiKats[®] mit *C. butyricum* über den Verlauf der längsten kontinuierlichen Fermentation, die durchgeführt wurde.

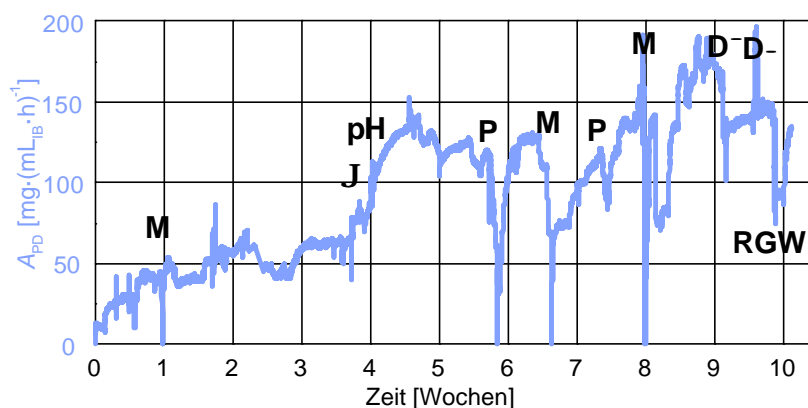


Abbildung 7-31: Verlauf der spezifischen Aktivität A_{PD} während einer kontinuierlich geführten Fermentation von *C. butyricum* in LentiKats® über mehr als 10 Wochen. Erst ab der achten Woche wurde teilweise Hefeextrakt zugegeben.

Bedeutung der Zeichen und Symbole in der Grafik: **M**: Mediumszulauf für 2 bis 4 h unterbrochen, **P**: Erhöhung der Konzentration des Phosphatpuffers auf etwa 100 mM, **J, pH**: Temperatur- und pH-Optimierungsversuche, **D⁻**: Halbierung der Verdünnungsrate, **D**: kurzzeitige Erhöhung der Verdünnungsrate, **RGW**: vorübergehender Wechsel auf Rohglycerinwasser (9 %)

110

Die Grafik zeigt, wie die Immobilisate auch nach verschiedenen Störfällen und –einflüssen immer wieder rasch die ursprünglich hohe Aktivität erreichen. Trotz der vielen Schwankungen im Verlauf der Kurve, die durch die Störungen aber auch durch gezielte Eingriffe bei den durchgeführten Untersuchungen herrühren, kann die Abbildung die Langzeitstabilität verdeutlichen. Auch nach mehr als zehn Wochen waren die immobilisierten Zellen sehr aktiv. Bei stabilen äußeren Parametern war die PD-Bildung absolut stabil. Durch Wählen einer Verdünnungsrate konnte die gewünschte Produktivität reproduzierbar eingestellt werden.

Die mechanische Stabilität der LentiKats® nach der langen Zeit des Rührens mit einem Magnetrührkern war gut. Zwar wurde ein zunehmendes Zusammenrollen der Gel-Linsen beobachtet, jedoch konnte kein Abbau oder ein Zerfallen der Partikel festgestellt werden.

8 Zusammenfassung und Ausblick

8.1 PD-Bildung mit thermophilen Mikroorganismen

Um mittelfristig auch die aus oleochemischen Prozessen ablaufenden heißen Rohglycerinwässer *direkt* für die Biokonversion zu PD nutzen zu können, ist der Einsatz thermophiler Mikroorganismen wünschenswert.

In einem ausgedehnten Screening zeigte sich, dass nur wenige Mikroorganismen in der Lage sind, unter den gewählten Bedingungen PD zu bilden. Dennoch konnten erstmals thermophile PD-Bildner angereichert und als stabile Reinkulturen gewonnen werden. Durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen und des verwendeten Mediums konnte die erreichbare PD-Konzentration für den bislang leistungsfähigsten Stamm AT1 auf Werte im Bereich von 6 bis 7 g · L⁻¹ gesteigert werden. Sie liegt damit ebenso wie die erzielte PD-Produktivität von knapp 0,2 g · (L · h)⁻¹ um etwa einen Faktor zehn unterhalb der üblichen Werte für die PD-Bildung mit mesophilen Stämmen.

Basierend auf diesen Ergebnissen muss weiter versucht werden, die PD-Bildung des vorhandenen thermophilen Stammes zu optimieren. Eine Steigerung der Produktivität sollte mit einer verbesserten Immobilisierung der Zellen zu erreichen sein. Insbesondere die mangelnde Überlebensrate von AT1 und die Größe der hergestellten Alginateperlen verhinderten eine deutliche Produktivitätssteigerung. Das größte Problem für die Erhöhung der Leistungsfähigkeit von AT1 stellt sicherlich die bislang geringe Produkttoleranz dar. Eventuell ist hier durch Adaptierung oder Mutation die tolerierte c_{PD} zu steigern. Optimal wäre eine Möglichkeit zu kontinuierlichen Abtrennung der Produkte aus der Fermentationsbrühe. Anders als bei Ethanol, dessen Austrag bei einer Kultivierungstemperatur von 60 °C ohnehin nur schwierig zu verhindern ist, sind die organischen Säuren oder deren Salze – und das PD jedoch nur aufwändig abzutrennen.

Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen sollten weitere Proben von thermophilen Standorten auf PD bildende Mikroorganismen untersucht werden. Bei einem weiteren Screening verlangt die Produkttoleranz ein größeres Augenmerk. Für die durchzuführenden Arbeiten empfiehlt sich der Einsatz einer Anaerobierbank mit integrierter Inkubationsmöglichkeit, die Temperaturen bis zu 70 °C erlaubt. Die Arbeit würde so entscheidend erleichtert und die Bearbeitung größerer Probenmengen möglich. Eine entsprechende AB würde darüber hinaus auch die Untersuchung von Immobilisaten anaerober, thermophiler Bakterien besser ermöglichen.

8.2 Reproduzierbare Immobilisierung in LentiKats®

Die reproduzierbare Herstellung von Immobilisaten ist Voraussetzung für die Untersuchung verschiedener Einflussgrößen, die die Überlebensrate der zu immobilisierenden Zellen und damit die spätere Verteilung der Kolonien im Gel bestimmen. Im Falle von LentiKats® sind in erster Linie die Trocknungsdauer, der Trocknungsgrad und die Art des Rückquellens zu nennen. Selbstverständlich ist eine reproduzierbare Größe und Form der Immobilisatpartikel für die spätere Leistungsfähigkeit des immobilisierten Biokatalysators entscheidend. Die Kontrolle dieser Parameter ermöglicht auch die Übertragung der Immobilisierung vom Labormaßstab in die technische Anwendung. Mit der Konzeption des LentiKat®Printers wurden die notwendigen Voraussetzungen für die Untersuchung der Immobilisierung von Clostridien und darüber hinaus geschaffen.

8.3 PD-Bildung mit *C. butyricum* NRRL B-1024 – Immobilisierung in LentiKats®

In den Versuchen mit freien Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024 konnte nachgewiesen werden, dass dieser Stamm einen leistungsfähigen PD-Produzenten darstellt. Seine Glycerintoleranz ist mit 80 bis 100 g · L⁻¹ wahrscheinlich für den technischen Einsatz ausreichend. Zudem ist *C. butyricum* NRRL B-1024 in der Lage, verschiedene Rohglycerine für die PD-Bildung zu nutzen. Die Nutzung kostengünstiger Rohstoffe ist unabdingbare Voraussetzung für einen konkurrenzfähigen biotechnischen Prozess. Es müssen möglichst verschiedene Rohglycerine unterschiedlicher Herkunft auf ihre Eignung für die PD-Herstellung überprüft werden. Die Erfahrungen mit einer verunreinigten Rohglycerincharge zeigen, dass auch solchen Störungen Rechnung getragen werden muss.

Im Gegensatz zu vielen anderen PD bildenden Mikroorganismen konnte mit *C. butyricum* NRRL B-1024 die parallele Umsetzung von Glycerin und Glucose bzw. Saccharose gezeigt werden. Es war so möglich, das vergleichsweise teure Glycerin vollständig zu PD umzusetzen, während für die Energie- und Biomassegewinnung die kostengünstigeren Kohlenhydrate verwendet wurden. Die Auswirkungen der Nutzung verschiedener nachwachsender Rohstoffe für die Herstellungskosten von 1,3-Propandiol verdeutlicht Tabelle 8-1. Sie basiert auf folgenden vereinfachenden Annahmen: Umsetzung von Glycerin zu PD durch *C. butyricum* mit einer realistischen Ausbeute von 0,50 kg PD je kg Glycerin (**a**, **c**), Umsetzung von Glucose zu Glycerin mit einer optimalen molaren Ausbeute von 1,00, also 0,50 kg Glycerin je kg Glucose (**c**), bei Co-Fermentation von Glucose und Glycerin mit gleicher Konzentration wird Glycerin mit einer molaren Ausbeute von 1,00 zu PD umgesetzt, also 1,0 kg PD je 1,2 kg Glycerin (**b**), Umsetzung von Zucker zu PD mit einer Ausbeute von 0,5 kg PD je kg Zucker (**d**).

Tabelle 8-1: Gegenüberstellung der benötigten Substratmengen für verschiedene mögliche Verfahren zur biotechnischen Herstellung von PD aus nachwachsenden Rohstoffen.

	(a)	(b)	(c)	(d)
Biokatalysator	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i>	Hefe und <i>Clostridium</i>	Idealer GVO
Eingesetztes Substrat	Glycerin	Glycerin + Zucker	Zucker	Zucker
Zuckermenge [kg]	-	1200	4000	2000
kg Glycerin je kg Zucker	-	-	0,50	
Glycerinmenge [kg]	2000	1200	2000	0,5 kg PD je 1,0 kg Zucker
kg PD je kg Glycerin	0,50	0,83	0,50	
Propandiolmenge [kg]	1000	1000	1000	1000

Basierend auf den Werten der Tabelle können die Rohstoffkosten für eine bestimmte Menge an PD für die einzelnen aufgeführten biotechnischen Verfahren ermittelt werden. Abbildung 8-1 zeigt einen Vergleich der Rohstoffkosten.

Nach Maßgabe eines oberen Rohstoffpreises von 1500 DM je t PD zeigt die Darstellung (**a**), dass die Glycerinkosten unterhalb etwa 750 DM je t Voraussetzung für die Konkurrenzfähigkeit des „konventionellen“ Verfahrens mit *Clostridium* und Glycerin sind. Wird ein zweistufiges Verfahren mit einer Glycerin bildenden Hefe und *Clostridium* genutzt, sind Zuckerpreise von maximal etwa 350 DM je t erforderlich (**c**). Gäbe es einen idealen GVO, der Zucker direkt und vollständig zu PD umsetzte, wäre dies ungeachtet des Zuckerpreises das jeweils wirtschaftlichste Verfahren (**d**). Der Darstellung in (**b**) kann man verschiedene Aussagen entnehmen. Auch bei Glycerinpreisen oberhalb von 750 DM je t können die Rohstoffkosten je t PD unterhalb von

1500 DM je t gehalten werden, wenn der Zuckerpreis entsprechend niedrig ist – beispielweise 250 DM je t Zucker bei einem Glycerinpreis von 1000 DM je t. Des weiteren ist bei einem derzeitigen Zuckerpreis von etwa 250 DM je t eine gleichzeitige Nutzung von Glycerin und Zucker nur dann sinnvoll, wenn der Glycerinpreis mehr als 350 DM je t beträgt (Schnittpunkt der beiden gestrichelten blauen Linien, o).

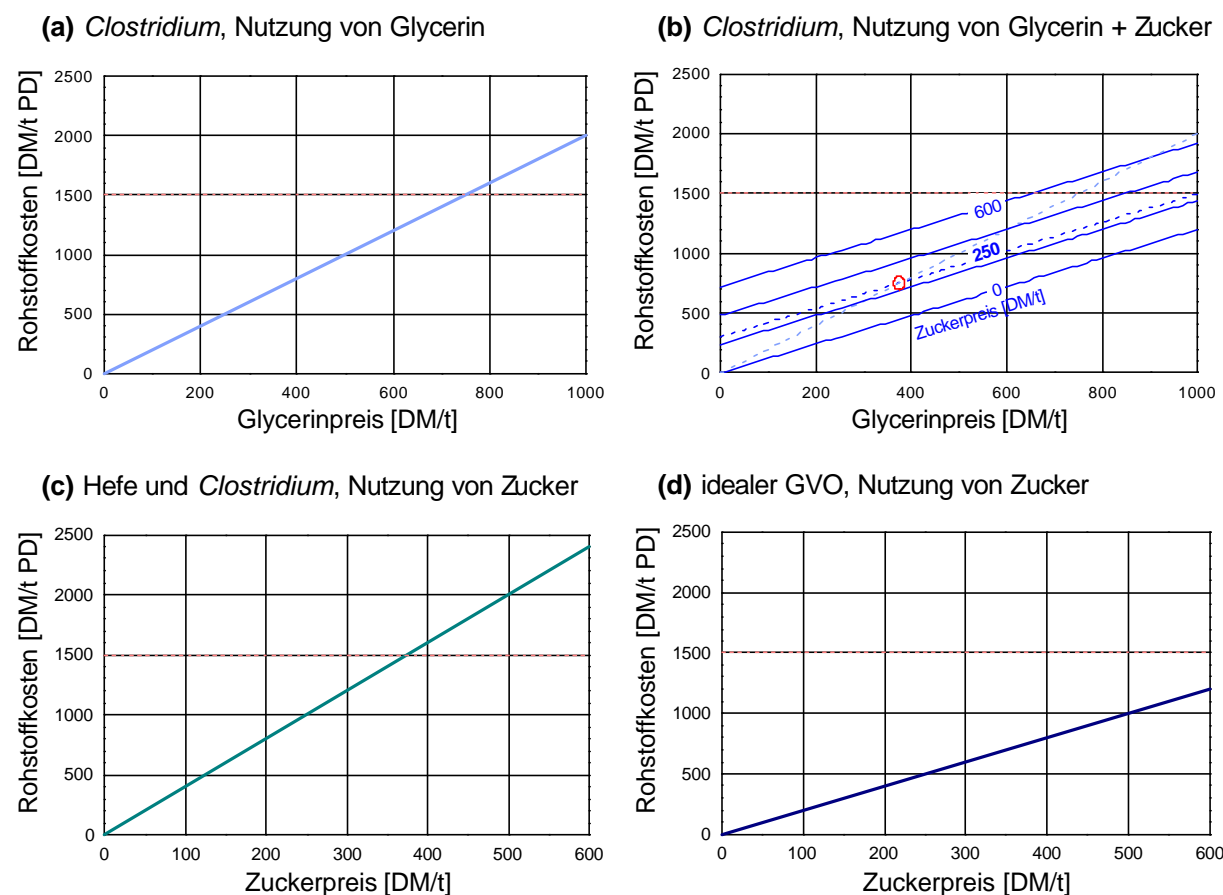


Abbildung 8-1: Vergleichende Darstellung der Rohstoffkosten für die einzelnen in Tabelle 8-1 aufgeführten biotechnischen Verfahren. Gezeigt ist die Abhängigkeit von den Weltmarktpreisen für Glycerin und Zucker. Die Buchstaben für die einzelnen Graphen entsprechen den Buchstaben in Tabelle 8-1. Die gestrichelte hellrote Linie markiert die Rohstoffkosten bei 1500 DM je t PD. Dieser Wert markiert in etwa den Bereich, in dem sich die Rentabilität für den biotechnischen Prozess entscheidet (vgl. Abbildung 3-1).

Neben der Einsparung von Kosten kann die Nutzung von Kohlenhydraten als Co-Substrat eine weitere sehr wichtige Rolle spielen. Sie ermöglicht es, auch mit verdünnten Rohglycerinwässern hohe PD-Konzentrationen erzielen zu können. Bei einer Ausbeute von 0,5 kg PD je kg Glycerin können aus einem Rohglycerinwasser mit 9 % (w/v) Glycerin nur $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PD produziert werden. Für eine höhere Konzentration müsste konzentrierteres, teures Glycerin zugefüttert werden. Das gleiche Rohglycerinwasser kann hingegen bei gleichzeitiger Fütterung von Kohlenhydraten und damit möglicher hundertprozentiger Ausbeute zu einer c_{PD} von etwa $74 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ umgesetzt werden.

In Fermentationen mit *C. butyricum* NRRL B-1024 wurde eine PD-Konzentration von maximal $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ erzielt. Für einen technischen Prozess wird eine möglichst hohe Produktkonzentration angestrebt, da die Aufreinigung so erleichtert wird. Bereits erfolgte weiterführende Versuche mit

C. butyricum NNRL B-1024 zeigten, dass eine Adaptierung an höhere PD-Konzentrationen möglich ist. Bei wiederholter Stammhaltung auf Mineralsalzmedium mit einer vorgelegten hohen c_{PD} eine immer bessere Toleranz gegenüber PD beobachtet. Mit dem so adaptierten Stamm konnte in einer *fed-batch*-Fermentation eine c_{PD} von etwa $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht werden.

Die Einschlussimmobilisierung in LentiKats® wurde erstmals für einen strikt anaeroben Bakterienstamm eingesetzt. Bedingt durch die schonenden Immobilisierungsbedingungen – insbesondere die kurze Dauer der Einschlussprozedur – konnte eine gute Überlebensrate erzielt werden. Es wurde ein Methode entwickelt, um die Biomasse für die Immobilisierung reproduzierbar vorzukultivieren. Mit der so erzielten Zellzahl ist es möglich, ohne eine Aufkonzentrierung (Zentrifugation) der Biomasse LentiKats® mit einer optimalen Kolonieverteilung herzustellen. Dazu wird etwa ein Fünftel des herzustellenden Immobilisatvolumens als Vorkultur benötigt. Da diese Vorkultur steril hergestellt werden muss, ist eine weitere Reduzierung des erforderlichen Volumens wünschenswert. Dies ist entweder durch eine höhere Überlebensrate der Zellen oder eine höhere Zelldichte möglich. Versuche in dieser Richtung können sich mit der erhöhten Sporulation der Clostridien, dem Zusatz von Reduktionsmitteln zur PVA-Lösung, einem Ausschluss von Sauerstoff bei der technischen Herstellung von LentiKats® oder auch einer Vorkultivierung in kontinuierlicher Kultur mit hoher Zelldichte beschäftigen.

Im Bereich Immobilisierung in LentiKats® wurde zunächst mit der Entwicklung einer einfachen Labormethode die Grundlage für die reproduzierbare Herstellung der Gel-Linsen und damit deren Optimierung geschaffen. Die Untersuchungen zur Biomasseanfangsbeladung zeigen, dass der optimale Bereich für eine hohe Produktivität der Immobilisate bei etwa $1 \text{ bis } 5 \times 10^7$ Zellen je mL liegt. Werden jedoch deutlich größere oder kleinere LentiKats® hergestellt, muss hierfür wiederum eine Optimierung durchgeführt werden. Die für die Gelierung der Immobilisatpartikel notwendige Teiltrocknung konnte im Labormaßstab bis zu einer Stunde dauern, ohne dass sich deutliche Einbußen bei der erreichten Überlebensrate und damit der späteren Koloniedichte der LentiKats® ergeben hätten. Auch das Rückquellen und Stabilisieren der Gel-Linsen mit einer einfachen Stabilisierungslösung anstelle von Kultivierungsmedium ist problemlos möglich. Beide Aspekte sind für die Realisierung der technischen Herstellung von LentiKats® mit *C. butyricum* wichtig.

Sowohl in den *batch*- und *fed-batch*-Fermentationen als auch insbesondere in den kontinuierlichen Fermentationen von LentiKats® mit immobilisiertem *C. butyricum* konnte der große Nutzen des Geleinschlusses in LentiKats® für die PD-Bildung gezeigt werden.

Tabelle 8-2 soll die Einordnung der in dieser Arbeit erzielten Daten der PD-Bildung ermöglichen. Die Tabelle zeigt, dass die mit den LentiKats® in dieser Arbeit erzielten Werte für die PD-Produktivität die bislang höchsten überhaupt sind. Gleichzeitig wird jedoch deutlich, dass die ebenso wichtige maximal erreichte PD-Konzentration noch deutlich gesteigert werden muss.

Tabelle 8-2: Vergleich der innerhalb dieser Arbeit erzielten Daten für die PD-Bildung mit Angaben aus verschiedenen Publikationen.

Organismus, Quelle	Typ	S / I	C _{Glyc} [g· L ⁻¹]	C _{PD} [g· L ⁻¹]	Y _{PD} kg· kg ⁻¹]	P _{PD} [g· (L· h) ⁻¹]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>						
TAG 1990	batch	S	122	56,2	0,46	2,3
	Konti	S	40	18,6	0,47	5,0
	---	S	40	19,1	0,55	7,2
	---	S	63	29,9	0,54	8,1
HELD 1996	fed-batch	S	k.A.	72,8	0,40	2,5
LUTZ 1999	batch	I	40	13,5	0,44	26
<i>Citrobacter freundii</i>						
PFLUGMACHER und GOTTSCHALK 1994	Konti	I	36,8	15,7	0,45	6,2
	---	I	36,8	16,4	0,47	8,2
<i>Clostridium butyricum</i>						
GÜNZEL <i>et al.</i> 1991	batch	S	50	23,2	0,49	2,2
	fed-batch	S	21	58,0	0,60	2,7
BIEBL <i>et al.</i> 1992	batch	S	52	29,5	k.A.	2,3
	---	S	110	56,0	k.A.	1,9
	fed-batch	S	84	47,0	k.A.	2,2
SAINT-AMANS <i>et al.</i> 1994	fed-batch	S	65	65	0,47	1,2
PETITDEMANGE <i>et al.</i> 1995	fed-batch	S	50	65,6	0,54	1,4
ABBAD-ANDALOUSSI <i>et al.</i> 1995	fed-batch	S	130	70,6	0,54	0,8
REIMANN A 1997	Konti	S ^{*)}	55,2	26,6	0,52	13,5
			55,7	22,8	0,52	16,6
			56,5	20,9	0,50	21,5 ^{3*)}
HIMMI <i>et al.</i> 1999	batch	S	121	65,4	0,54	1,7
PAPANIKOLAOU <i>et al.</i> 2000	Konti	S	90	26,1	0,57	5,5
	Konti ^{**))}	S	90	41	k.A.	3,4
SCHLIEKER <i>et al.</i> 2001	fed-batch	S	50	71,6	0,51	2,3
(diese Arbeit)	fed-batch	I	105	48,5	0,50	2,1
	Konti	I	93,4	30,0	0,40	17,6
			94,1	23,7	0,43	28,9
			95,6	14,9	0,43	35,0
nicht identifizierte Mikroorganismen						
SCHLIEKER <i>et al.</i> 2001	fed-batch	S	46	84,1	0,48	2,0
gentechnisch veränderter Stamm von <i>Escherichia coli</i>						
WO 01/12833A2 Patent 2001	fed-batch	S	12,6 ^{4*)}	129	0,34 ^{5*)}	1,7

S: suspendierte, I: immobilisierte Zellen,

^{*)} Membranreaktor mit Zellrückhaltung, ^{**)} zweistufiger Fermenter, ^{3*)} Standzeit beträgt nur wenige Tage,

^{4*)} Glucosekonzentration, ^{5*)} Ausbeute bezogen auf Glucose

Hierbei sind vor allem drei Ansatzpunkte zu nennen, eine *Adaptierung der Zellen*, eine optimale *Prozessführung* und eine *Optimierung der Immobilisate* in Richtung hoher Produktkon-

zentrationen. Diese drei Ansatzpunkte greifen im optimalen Fall ineinander, sollen hier jedoch getrennt voneinander diskutiert werden.

Bezüglich der Prozessführung verbietet sich aus Sicht der gefundenen Ergebnisse ein einstufiger *batch*-Prozess. Die bei kontinuierlichen Betrieb erreichten Werte zeigen dagegen Ansatzpunkte, um hohe Produktivität und Produktkonzentration miteinander zu verknüpfen. Hierfür bietet sich ein mehrstufiger Prozess an. Für die erste Stufe kommt nach Abbildung 7-28 ein CSTR mit Immobilisaten bei einer Verweilzeit von etwa $1,5 \text{ h}^{-1}$ in Frage. Bei einer Zulaufkonzentration von $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glycerin wird so etwa die Hälfte des Substrates umgesetzt. Die Produktivität liegt im Bereich von $30 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$, die erreichte c_{PD} oberhalb von $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Die zweite Stufe muss bei geringerer Verdünnungsrate, sprich größerer Verweilzeit betrieben werden. Das Reaktionsgefäß muss um einen entsprechenden Faktor vergrößert werden. Durch die höhere Verweilzeit soll trotz der durch die vorliegenden Produkte verminderte Aktivität die PD-Konzentration deutlich gesteigert werden. Eine ähnliches Vorgehen schlagen PAPANIKOLAOU *et al.* für die Fermentation freier Zellen von *C. butyricum* für die PD-Herstellung vor (PAPANIKOLAOU *et al.* 2000).

Die zweite kontinuierliche Stufe sollte nicht bis zur gewünschten Endkonzentration an PD geführt werden. Die Produktivität der zweiten Stufe wäre sonst minimal, da bei kontinuierlichem Betrieb die Umsetzung bei einem ungünstigen Arbeitspunkt stattfände. Der Inhalt ist gleich dem Ablauf, und die Substratlimitierung und die Produktinhibierung wären für die gesamte Umsetzung in der Stufe maximal. Es sollte also lediglich eine PD-Konzentration angestrebt werden, die noch eine gute Produktivität zulässt.

Grundsätzlich ist für Reaktionen, bei denen hohe Produkt- und möglichst geringe Substratkonzentrationen erreicht werden sollen, eine kontinuierlich geführter Fermenter nicht die richtige Wahl für die abschließende Stufe. Dahingegen könnte sich an die beiden kontinuierlichen Stufen entweder ein kontinuierliches Strömungsrohr (suspendierte Zellen) bzw. Festbettreaktor (immobilisierte Zellen) oder aber ein gerührter *batch*-Fermenter anschließen. Strömungsrohr und Festbettreaktor sind für die Umsetzung von Glycerin zu PD grundsätzlich wenig geeignet, da das Absinken des pH-Wertes aufgrund der gebildeten Säuren nur schlecht zu verhindern ist und die Zellen sich selbst inhibieren. Bleibt der *batch*-Fermenter. Dieser müsste, um mit der kontinuierlichen Stufe kombinierbar zu sein, aus einer Reihe größerer Reaktoren bestehen, die nacheinander befüllt werden, nach einer gewissen Reaktionszeit geerntet und gereinigt werden, und anschließend wieder erneut befüllt werden können. Unter dem Gesichtspunkt, eine möglichst glycerinarmer Produktlösung für die Aufreinigung zur Verfügung zu stellen ist die im Überstand der Immobilisate vorhandene Biomasse positiv zu bewerten, da die freien Zellen einen deutlich geringeren k_{S} -Wert besitzen und bei kleinen Glycerinkonzentrationen aktiver sind. Je nach erreichter Konzentration sollte die dritte, absatzweise Stufe ganz ohne Immobilisate betrieben werden – insbesondere vor dem Hintergrund der beobachteten vorübergehenden Inhibierung der immobilisierten Biomasse nach Erreichen hohen PD-Konzentrationen (vgl. 7.9.6). In der letzten Stufe der Umsetzung kann möglicherweise durch geeignete Einstellung der Prozessparameter (niedrigere Temperatur, höherer pH-Wert) die schädliche Wirkung der Produkte gemindert werden.

Ein weiterer entscheidender Aspekt beim Bemühen, hohe Produktivität und PD-Konzentration miteinander zu vereinen, ist die Produkttoleranz des eingesetzten PD bildenden Stammes. Bei entsprechend hoher PD-Toleranz kann die Umsetzung, beispielsweise in einer ersten Stufe eines Prozesses, länger bei hoher Produktivität fortgeführt werden. Wichtiger jedoch dürfte die gesteigerte Zellaktivität für die Endphase der Umsetzung sein. Neben verschiedenen Ansätzen

die PD-Toleranz von *C. butyricum* durch forcierte Mutation und Selektion zu erhöhen, hat sich bei fortführenden Arbeiten mit *C. butyricum* NRRL B-1024 die Strategie einer erzwungenen Adaptierung als aussichtsreich erwiesen. Wie bereits erwähnt, führte eine wiederholte Stammhaltung von Zellen des Clostridienstammes, die mit einer c_{PD} von $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gewachsen waren, auf einem Medium mit erhöhtem PD-Gehalt zu einer veränderten Kultur, mit der in Fermentationsexperimenten bis zu etwa $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PD erreicht wurden. Dies bedeutet eine signifikante Steigerung gegenüber den mit nicht adaptierten Zellen von *C. butyricum* bis dahin erreichten etwa $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (vgl. Abbildung 7-4). Durch Bemühungen zur weiteren Adaptierung der Zellen scheinen noch höhere PD-Konzentration mit *C. butyricum* NRRL B-1024 erreichbar. Eine weitere Möglichkeit, Zellen mit hoher Produkttoleranz einsetzen zu können, stellt die Suche nach neuen Bakterienstämmen dar. Mit einem von ILONA KOSCHIK am Institut für Technologie und Biosystemtechnik der FAL aus einer Bodenprobe isolierten Clostridienstamm (IK96) konnte in einer ersten, nicht optimierten Fermentation eine PD-Konzentration von $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ erzielt werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt, die erreichbare PD-Konzentration bei gleichzeitig hoher Produktivität zu steigern, betrifft die Immobilisierung der Clostridien. Bei allen Bemühungen zur Optimierung der Biomasseanfangsbeladung (BAB) wurde mit dem Ziel einer möglichst hohen Produktivität vorgegangen und nicht mit dem Ziel einer hohen Produktkonzentration. Insbesondere bei nicht zu vernachlässigenden Diffusionswiderständen der Produkte im Immobilisat (vgl. 7.9.6) und gleichzeitig extrem hoher Produktivität sind beide Ziele nicht ohne weiteres vereinbar. Je höher die spezifische Aktivität der Immobilisate, desto wichtiger wird der schnelle Abtransport der Produkte, um eine Inhibierung der Zellen zu vermeiden. Es darf sicher nicht erwartet werden, dass sich die Zellen durch eine Anhäufung von Produkten ausreichend in sinnvoller Zeit selbst drosseln. Vielmehr müsste mit einer niedrigeren BAB auf Kosten der Produktivität für eine ausreichende Abflussmöglichkeit der Produkte gesorgt werden, die insbesondere für hohe Produktkonzentrationen und die damit verbundenen kleinen Transportgradienten ausreichend sind. Prinzipiell gilt es also mit der richtigen BAB einen Kompromiss zwischen einer optimalen Produktivität und einem optimalem Abtransport der Produkte, also maximaler Produktkonzentration, zu finden.

Statt eines entsprechenden Immobilisates ist es jedoch auch möglich, bei Nutzung eines mehrstufigen Prozesses quasi maßgeschneiderte Immobilisate in jeder Stufe einzusetzen. In der ersten Stufe ist c_{PD} noch vergleichsweise niedrig. Diese bedeutet eine hohe Aktivität der Biomasse, also viel PD abzutransportieren, jedoch auch einen guten Transportgradienten. In der folgenden Stufe ist durch die höhere Produktkonzentration die Biomasseaktivität deutlich gemindert jedoch gleichzeitig der Transport auch erschwert. Je nachdem, ob die Geschwindigkeit der Produktion oder die Geschwindigkeit des Transportes entscheidend ist, muss die Besiedlungsdichte der Immobilisate für die einzelnen Stufen gewählt werden. Für Stämme mit erhöhter Produkttoleranz kann generell eine dichtere Besiedelung der Immobilisate vorgesehen werden. Durch eine entsprechende weitere Optimierung der Immobilisate, vor allem aber durch Einsatz eines produkttoleranten Clostridienstammes und einer geeigneten Prozessführung sollten die mit den LentiKats® erreichbaren hohen PD-Produktivitäten mit hohen Produktkonzentrationen gut in Einklang gebracht werden können.

Ein wichtiger Aspekt bei der weiteren Entwicklung eines biotechnischen Prozesses zur Produktion von PD stellt die Herstellung der Immobilisate im großen Maßstab dar. Die Grundlage hierfür konnten mit der vorliegenden Arbeit gelegt werden. Die technische Realisierung ist Gegenstand eines Folgeprojektes. Die Menge an Immobilisat, die für eine großtechnische Produktion von PD benötigt wird, soll im folgenden für eine Jahresproduktion von 2.000 t grob abgeschätzt

werden. Aufgrund der Erfordernisse einer PD-Produktion in unmittelbarer Nähe zu oleochemischen Anlagen soll mit dieser verhältnismäßig kleinen Menge gerechnet werden.

Es wird von einer erreichbaren Gesamtproduktivität von $10 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{h})^{-1}$ und einer Endkonzentration von $75 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ausgegangen. Die Anlage soll 8.000 h im Jahr betrieben werden. Es ergibt sich ein Volumen an Produktlösung von etwa 26.500 m^3 , also $3,3 \text{ m}^3$ je Stunde. Bei einer Verdünnungsrate von $1,5 \text{ h}^{-1}$ für die erste Fermentationsstufe folgt für diesen Reaktor ein Volumen von lediglich $2,2 \text{ m}^3$. Wenn die Verweilzeit der zweiten Stufe das Dreifache der ersten Stufe beträgt, ist das Gesamtvolumen der Reaktoren der beiden Stufen etwa 9 m^3 . Bei einem Immobilisatanteil von $200 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ergibt sich demnach eine Menge von 1.800 kg . Ein kompletter Austausch verbrauchter Immobilisate durch neue LentiKats® zu einem bestimmten Zeitpunkt ist unrealistisch. Eine Vorkultivierung einer solch großen Menge würde einen wenigstens ebenso großen Fermenter benötigen wie die Umsetzung selbst. Praktikabler erscheint die quasi kontinuierliche Herstellung und Zugabe von frisch hergestellten LentiKats® mit *C. butyricum*. Bei einer Standzeit von 100 Tagen könnten je Tag 18 kg neue Immobilisate hergestellt und den Reaktoren zugegeben und gleichzeitig 18 kg verbrauchte Immobilisate entfernt werden. Diese kontinuierliche Form der LentiKats®-Herstellung bewirkt gleichzeitig eine konstante Leistungsfähigkeit der Anlage und eine größere Unabhängigkeit von Störungen bei der Immobilisierungsprozedur und der Vorkultivierung. Das Volumen der benötigten Vorkultur ist mit 3 bis 4 Litern ebenfalls gering. Die benötigte Biomasse könnte bei einer Wachstumsrate μ von $0,2 \text{ h}^{-1}$ einem kontinuierlichen Fermenter mit einem Reaktorvolumen V_R von nur 1000 mL bereitgestellt werden.

Trotz dieser Vorzüge müssen Vorkehrungen für eine mögliche Herstellung größerer Mengen an LentiKats® in kürzerer Zeit getroffen werden, um auf Störungen, wie etwa Kontaminationen, reagieren zu können oder eine routinemäßige Leerung, Reinigung und zügige Wiederinbetriebnahme der Anlage zu ermöglichen.

9 Literatur

- ABBAD-ANDALOUSSI S, MANGINOT-DÜRR C, AMINE J, PETITDEMANGE E, PETITDEMANGE H. 1995. Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl Environ Microbiol.* **61**:4413-4417
- ABBAD-ANDALOUSSI S, AMINE J, GERARD P, PETITDEMANGE H. 1998. Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *J Appl Microbiol.* **84**:515-522
- AHRENS K, MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD. 1998. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation. *Bioeng Biotechnol.* **59**(5):544-552
- ARIGA O, ITOH K, SANO Y, NAGURA M. 1994. Encapsulation of biocatalysts with PVA capsules. *J Ferment Bioeng.* **78**:74-78
- BAIMURATOV E, KALONTAROV IY, SAIDOV DS. 1993. The influence of reactive dyes on thermo-, α -radiation and photooxidative degradation of stressed polyvinyl alcohol. *Intern J Polymeric Mater.* **19**:193-199
- BATZER H. 1985. Polymere Werkstoffe. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
- BERGÈRE JL, HERMIER J. 1965. Étude des facteurs contrôlant la croissance et la sporulation de *Clostridium butyricum*. *Ann I Pasteur.* **109**:80-89
- BG Chemie. 1998. Sichere Biotechnologie. Eingruppierung biologischer Agenzien: Bakterien. Merkblatt B 006, 8/98, ZH 1/346. Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, Jedermann-Verlag Dr. Otto Pfeffer oHG. Heidelberg
- BIEBL H. 1991. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *C. butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotechnol.* **35**:701-705
- BIEBL H, MARTEN S, HIPPE H, DECKWER WD. 1992 Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Appl Microbiol Biotechnol.* **43**:786-793
- BIEBL H, MARTEN S. 1995. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol: Use of cosubstrates. *Appl Microbiol Biotechnol.* **44**:15-19
- BIEBL H, MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD. 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:289-297
- BIOTICA Marktstudie, PERP, ChemSystems. 1999. Internet-Information.
URL: <http://www.chemsystems.com>
- BISPING B, BAUMANN U, REHM H-J. 1990. Production of glycerol by immobilized *Pichia farinosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **32**:380-386
- BLÜMEL M. 1999. Optimierung und Charakterisierung von Polyvinylalkohol-Hydrogel-Einschluß-immobilisaten. Universität Oldenburg, Diplomarbeit
- BROCK TD. 1986. Biology of microorganisms. 7. Auflage, Prentice Hall. Englewood Cliffs
- BROEKHUIS RR, LYNN S, KING CJ. 1994. Recovery of propylene glycol from dilute aqueous solutions via reversible reaction with aldehydes. *Ind Eng Chem Res.* **33**:3230-3237

BROEKHUIS RR, LYNN S, KING CJ. 1996. Recovery of propylene glycol from dilute aqueous solutions by complexation with organoboronates in ion-pair extractants. *Ind Eng Chem Res.* **35**:1206-1214

CAMERON DC, ALTARAS NE, HOFFMAN ML, SHAW AJ. 1998. Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol Prog.* **14**:116-125

CANGANELLA F, WIEGEL J. 1993. The potential of thermophilic clostridia in biotechnology. In: The clostridia in biotechnology. WOODS DR, Herausgeber. Butterworth. Stoneham.

CHANG HN, MOO-YOUNG M. 1988. Estimation of oxygen penetration depth in immobilized cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* **29**:107-112

ChemExpo. 1998. Chemical profile of polyvinyl alcohol.

URL: <http://www.chemexpo.com/news/PROFILE980112.cfm>

CHITLARU E, PICK U. 1990. Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*. *Plant Physiol.* **96**:50-60

CHMIEL H, WALITZA E. 1991. Transportvorgänge in Biosuspensionen. In: Bioprozeßtechnik 1. CHMIEL H, Herausgeber. UTB Gustav Fischer Verlag. Stuttgart

CHUAH H. 1996. „Corterra“ poly (trimethylenterephthalate) - a new polymeric fiber for carpets. *Chem Fibers Int.* **46**(6):427-428

COLLIER RE. 1957. An approach to synchronous growth for spore production in *Clostridium roseum*. *Publ AIBS.* **5**:10-17

COMPAGNO C, BOSCHI F, RANZI BM. 1996. Glycerol production in a triose phosphate deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog.* **12**:591-595

ConduxConsulting. 2000a. Internet-Information.

URL: <http://www.conduxconsulting.com/pttdupont.htm>

ConduxConsulting. 2000b. Internet-Information.

URL: <http://www.conduxconsulting.com/pttshellkosa.htm>

ConduxConsulting. 2000c. Internet-Information.

URL: <http://www.conduxconsulting.com/Whats-New.htm>

DABROCK B, BAHL H, GOTTSCHALK G. 1992. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl Environ Microbiol.* **58**(4):1233-1239

DECKWER WD. 1995. Microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol. *FEMS Microbiol Reviews.* **16**:143-149

DODDS KL. 1989. Combined effect of water activity and pH on inhibition of toxin production by *Clostridium botulinum* in cooked, vacuum-packed potatoes. *Appl Environ Microbiol.* **55**(3):656-660

DOUGLAS SR, FLEMING A, COLEBROOK L. 1917. On the growth of anaerobic bacilli in fluid media under apparently aerobic conditions. *The Lancet.* **2**:530-532

DSMZ. 2000. Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

Katalog mikrobieller Stämme – Medienliste.

URL: <http://www.dsmz.de/media/med144.htm>

Dupont. 1999. Internet-Information.

URL: <http://www.dupont.com/corp/whats-new/releases/99/991122.html>

Dupont. 2000. Internet-Information.

URL: <http://www.dupont.com/sorona/>

EINSELE A, FINN RK, SAMHABER W. 1985. Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik. VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim

ELM R, FALBE J, GELBKE HP. 1980. Propandiole. In: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie. BARTHOLME E, Herausgeber. **19**:425-431. 4. neubearbeitete und erweiterte Auflage. Verlag Chemie. Weinheim

FINCH CA (Herausgeber). 1992. Polyvinyl alcohol – developments. 2. Ausgabe. John Wiley & Sons. Weinheim

FORAGE RG, FOSTER MA. 1982. Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases. *J Bacteriol.* **149**(2):413-419

FORSBERG CW. 1987. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Appl Environ Microbiol.* **53**(4):639-643

FÖRBERG C, ENFORS S-O, HÄGGSTRÖM L. 1983 Control of immobilized, non-growing cells for continuous production of metabolites. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* **17**:143-147

FORD GC. 1997. ADM plans C.R. bioproducts plant. The Gazette online, Cedar Rapids, Iowa. 08.05.1997. URL : <http://www.gazetteonline.com/money/mon109.htm>

FRANK HA, LUM NA. 1969. Sporulation of putrefactive anaerobe 3679 in a chemically defined medium. In: Spores **IV**. CAMPBELL HH, Herausgeber. American Society for Microbiology. Bethesda, Maryland

FREDETTE V, PLANTÉ C, ROY A. 1967. Numerical data concerning the sensitivity of anaerobic bacteria to oxygen. *J Bacteriol.* **93**:2012-2017

FUJII S. 1994. Effect of Ca^{2+} on the retention of glycerol and amino acids in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Cell Environ.* **17**:227-230

FUJII S, HELLEBUST JA. 1992. Release of intracellular glycerol and pore formation in *Dunaliella tertiolecta* exposed to hypotonic stress. *Can J Bot.* **70**:1313-1318

GEMEINER P, KURILLOVÁ L, MARKOVIC O, MALOVIKOVA A, UHRIN D, ILAVSKY M, STEFUCA V, POLAKOVIC M, BALEŠ V. 1991. Calcium pectate gel beads for cell entrapment. 3. Physical properties of calcium pectate and calcium alginate gel beads. *Biotechnol Appl Biochem.* **13**:335-345

geniaLab. 2001. LentiKats® „Tips&Tricks“, Informationsbroschüre der geniaLab® BioTechnologie GmbH, Braunschweig.

GIBBS BF, KERMASHA S, ALLI I, MULLIGAN CN. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *Int J Food Sci Nutr.* **50**(3):213-224

GLASS KA, DOYLE MP. 1991. Relationship between water activity of fresh pasta and toxin production by proteolytic *Clostridium botulinum*. *J Food Protect.* **54**(3):162-165

GONZÁLEZ-BENITO G, OZORES M, PEÑA M. 1994. Continuous glycerol production in a packed-bed bioreactor with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biores Technol.* **49**:209-212

- GOTTSCHAL JC, PRINS RA. 1991. Thermophiles: A life at elevated temperatures. *Trends Ecol Evol.* **6**(5):157-162
- GROBOILLOT A, BOADI DK, PONCELET D, NEUFELD RJ. 1991. Immobilization of cells for the food industry. *Crit Rev Biotechnol.* **14**(2):75-107
- GROTHER E, BIEBL H, DECKWER WD. 2000. Maßstabsvergrößerung, Aufarbeitung und ökonomische Aspekte der Glycerinvergärung zu 1,3-Propandiol mit Clostridien. 2. Workshop „Biokonversion nachwachsender Rohstoffe“, 14.-15.10.99. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe. Landwirtschaftsverlag Münster. **15**:313-321
- GROTHER E. 2000. Konzeption und Wirtschaftlichkeit der industriellen Glycerinvergärung zu 1,3-Propandiol. TU Braunschweig, Dissertation
- GÜNZEL B. 1991. Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol durch *Clostridium butyricum* und adsorptive Aufarbeitung von Diolen. TU Braunschweig, Dissertation
- GÜNZEL B, YONSEL S, DECKWER WD. 1991 Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m³. *Appl Microbiol Biotechnol.* **36**:289-294
- HÄGGSTRÖM L. 1981. Immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* for butanol production. In: Advances in Biotechnology II. MOO-YOUNG M, ROBINSON CW, Herausgeber. Pergamon Press, Oxford
- HÄGGSTRÖM L, ENFORS S-O. 1982 Continuous production of butanol with immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Biochem Biotechnol.* **7**:35-37
- HÄGGSTRÖM L, MOLIN N. 1980. Calcium alginate immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* for solvent production. *Biotechnol Letters.* **2**(5):241-246
- HAHN-HÄGERDAHL B, MATTIASSON B. 1982. Azide sterilization of fermentation media; ethanol production from glucose using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* **14**:140-143
- HARTMEIER W. 1986. Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer Verlag. Heidelberg
- HBI. 1999. Glycerine Market Report Nr. 46, September 1999. HB International S.A., Montmoryncy, Frankreich. URL <http://www.hbi.fr>
- HEMING M. 1999. Glycerine Market Report. CTVO-NET workshop co-products: glycerine. 21.01.1999, Paris, Frankreich. URL: http://www.dainet.de/fnr/ctvo/byproducts/heming_hbi.doc
- HEYNDRIX M, DE VOS P, VANCANNEYT M, DE LEY J. 1991. The fermentation of glycerol by *C. butyricum* LMG 1212 t₂ and 1213 t₁ and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl Microbiol Biotechnol.* **34**:637-642
- HIMMI EH, BORIES A, BARBIRATO F. 1999. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Biores Technol.* **67**:123-128
- HICKEY CS, JOHNSON MG. 1981. Effects of pH shifts, bile salts, and glucose on sporulation of *Clostridium perfringens* NCTC 8798. *Appl Environ Microbiol.* **41**:124-129
- Hoechst. 1991. Hoechst High Chem®. Mowiol® Polyvinylalkohol. Informationsbroschüre, Bezug über Clariant GmbH, Division Celluloseether & Polymerisate, D-65926 Frankfurt am Main

-
- HOLST O, MANELIUS A, KRAHE M, MÄRKL H, RAVEN N, SHARP R. 1997. Thermophiles and fermentation technology. *Comp Biochem Physiol.* **118a**(3):415-422
- HOLT JG, KRIEG NR, SNEATH PHA, STALEY JT, WILLIAMS ST. 1994. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. HENSYL WR, Herausgeber. 9. Auflage. Williams&Wilkins. München.
- HOWALDT M, CHMIEL H. 1990. Enzymkinetik. In: Bioprozeßtechnik 1. CHMIEL H, Herausgeber. UTB Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- HUMPHREYS FB. 1924. Formation of Acrolein from glycerol by *B. welchii*. *J Infect Dis.* **35**:282-290
- HUNGATE RE. 1969. A role-tube method for the cultivation of strict anaerobes. In: Methods in microbiology. NORRIS JR, RIBBONS DW, Herausgeber. **3b**:117-132. Academic Press. New York.
- JAHNZ U, SCHUBERT M, BAARS-HIBBE H, WALTER M, VORLOP KD. 2000. Thermotolerant inulinase II for production of DFA III from Inulin. World Congress of Biotechnology 2000, 3.-8.9.2000 Berlin. Book of Abstracts, **3**:516
- JEKEL M, BUHR A, WILLKE T, VORLOP KD. 1998. Immobilization of biocatalysts in LentiKats. *Chem Eng Tech.* **21**(3):275-278
- JUNG K, ZENG AP, DECKWER WD. 2000. Physiologische und enzymatische Charakterisierung der 1,3-Propandiol-Gewinnung aus Glycerin mit *Clostridium butyricum*. 2. Workshop „Biokonversion Nachwachsender Rohstoffe“ 14.-15.10.99. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe, Landwirtschaftsverlag Münster, **15**:244-252
- KLAPATCH TR, HOGSETT DAL, BASKARAN S, PAL S,LYND LR. 1994. Organism development and characterization for ethanol production using thermophilic bacteria. *Appl Biochem Biotechnol.* **45/46**:209-223
- KLEIN J, VORLOP KD. 1979. Immobilized whole cells. DECHEMA Monographien. **84**:265-335
- KNAYSI G, DUTKY SR. 1936. The growth of a butanol *Clostridium* in relation to the oxidation-reduction potential and oxygen content of the medium. *J Bacteriol.* **31**:137-149
- KIGLER IJ, GUGGENHEIM K. 1938. The influence of vitamin C on the growth of anaerobes in the presence of air, with special reference to the relative significance of E_h and O_2 in the growth of anaerobes. *J Bacteriol.* **35**:141-156
- KRAHE M, ANTRANIKIAN G, MÄRKL H. 1996. Fermentation of extremophile microorganisms. *FEMS Microbiol Rev.* **18**:271-285
- KUROSAWA H, TANAKA H. 1990. Advances in immobilized cell culture: Development of co-immobilized mixed culture system of aerobic and anaerobic microorganisms. *Process Biochem.* **25**:189-196
- KUZNETSOVA OG, ZYTNER YD, MAKAROV KA. 1992. Electrochemical degradation of polyvinyl alcohol. *J Appl Chem USSR.* **65**(1):2067-2070
- LABBE RG, DUNCAN CL 1974. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A under conditions of controlled pH and temperature. *Can J Microbiol.* **20**:1493-1501
- LABBE RG, TANG SS 1983. Conditions for production of initiation protein for germination of *Clostridium perfringens* spores. *Can J Microbiol.* **29**:829-832

- LARKING DM, CRAWFORD RJ, CHRISTIE GB, LONERGAN GT. 1999. Enhanced degradation of polyvinyl alcohol by *Pycnoporus cinnabarinus* after pretreatment with Fenton's reagent. *Appl Environ Microbiol.* **65**(4):1798-1800
- LJUNGDAHL LG, WIEGEL J. 1986. Working with anaerobic bacteria. In: Manual of industrial microbiology and biotechnology. DEMAIN AL, SOLOMON NA, Herausgeber. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- LONG S. 1984. Studies on the regulation of solvent production and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*. University of Cape Town, Dissertation
- LONG S, JONES DT, WOODS DR. 1983. Sporulation of *Clostridium acetobutylicum* P262 in a defined medium. *Appl Environ Microbiol.* **45**:1389-1393
- LONG S, JONES DT, WOODS DR. 1984. Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. *Appl Microbiol Biotechnol.* **20**:256-261
- LOZINSKY V, VAINERMAN ES, DOMOTENKO LV, MAMTSIS AM, TITOVA EF, BELAVTSEVA EM, ROGOZHIN SV. 1986. Study of cryostructurization of polymer systems. VII. Structure formation under freezing poly(vinylalcohol) aqueous solutions. *Colloid & Polymer Sci.* **264**:19-24
- LUTZ J. 1999. Optimierung der 1,3-Propandiol-Produktion aus Glycerin mit Einschlußimmobilisaten von *Klebsiella pneumoniae*. TU Braunschweig, Diplomarbeit
- LYND LR. 1989. Production of ethanol from lignocellulosic materials using thermophilic bacteria: critical evaluation of potential and review. In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology **38**. FIECHTER A, Herausgeber. Springer Verlag. Heidelberg
- MAIORELLA BL, BLANCH HW, WILKE CR. 1984. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. *Biotechnol Bioeng.* **26**:1003-1025
- MALINOWSKI JJ. 1999. Evaluation of liquid extraction potentials for downstream separation of 1,3-propanediol. *Biotechnol Tech.* **13**:127-130
- MALINOWSKI JJ. 2000. Reactive extraction for downstream separation of 1,3-propanediol – conversion to 2-methyl-1,3-dioxane and extraction using organic solvent. *Biotechnol Prog.* **16**(1):76-79
- MATTIASSEN B. 1983. Immobilization methods. In: Immobilized Cells and Organelles. MATTIASSEN B, Herausgeber. CRC Press. Boca Raton
- MCCLURE PJ, COLE MB, SMELT JPPM. 1994. Effects of water activity and pH on growth of *Clostridium botulinum*. *J Appl Bacteriol Symp Suppl.* **76**:105S-114S
- MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD. 1997. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol.* **20**:82-86
- MOORE WB. 1968. Solidified media suitable for the cultivation of *Clostridium novyi* type B. *J Gen Microbiol.* **53**:415-423
- MICKELSON MN, WERKMAN CH. 1940. Formation of trimethyleneglycol from glycerol by *Aerobacter*. *Enzymologia.* **8**:252-256
- MORRIS JG, O'BRIEN RW. 1971. In: Spore Research. BARKER AN, GOULD GW, WOLF J, Herausgeber. London. Academic Press, 1-38

-
- MURRELL. 1967. The biochemistry of the bacterial endospore. In: *Advances in Microbial Physiology*. ROSE AH, WILKINSON JF, Herausgeber. **1**:133-251. Academic Press. London
- MUSCAT A, BEYERSDORF J, VORLOP KD. 1993. Poly(carbamoylsulfonate), a material for immobilization: synthesis, diffusion- and mechanical properties. *Biotechnol Tech.* **7**:591-596
- NAKAS JP, SCHAEDELE M, PARKINSON CM, COONLEY CE, TANENBAUM SW. 1983. System development for linked-fermentation production of solvents from algal biomass. *Appl Environ Microbiol.* **46**(5):1017-1023
- NÄVEKE R, TEPPER KP. 1982. Einführung in die mikrobiologischen Methoden, Praktikumsskriptum, TU Braunschweig
- NEIJSSSEL OM, HUETING S, CRABBENDAM KJ, TEMPEST DW. 1975. Dual pathways of glycerol assimilation in *Klebsiella aerogenes* NCIB 418. *Arch Microbiol.* **104**:83-87
- ODIBO FJC, ULBRICH-HOFMANN R. 1996. Culture conditions for the production of amylolytic enzymes by a thermophilic *Clostridium* sp. *Acta Biotechnol.* **16**(4):283-292
- OHTA T, OGBONNA JC, TANAKA H, YAJIMA M. 1994. Development of a fermentation method using immobilized cells under unsterile conditions. 2. Ethanol and L-lactic acid Production without heat and filter sterilization. *Appl Microbiol Biotechnol.* **42**:246-250
- PAPANIKOLAOU S, RUIZ-SANCHEZ P, PARISSET B, BLANCHARD F, FICK M. 2000. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by newly isolated *Clostridium butyricum* strains. *J Biotechnol.* **77**:191-208
- PERKINS WE. 1965. Production of clostridial spores. *J Appl Bacteriol.* **28**(1):1-16
- PETITDEMANGE E, DÜRR C, ABBAD-ANDALOUSSI S, RAVAL G. 1995. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *J Ind Microbiol.* **15**:498-502
- PFLUGMACHER U, GOTTSCHALK G. 1994. Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **41**:313-316
- POTERA C. 1997. Genencor & Dupont create "green" polyester. *Genetic Engineering News* **17**:17
- PRÜSSE U. 2000. Entwicklung, Charakterisierung und Einsatz von Edelmetallkatalysatoren zur Nitratreduktion mit Wasserstoff und Ameisensäure sowie des Strahlschneider-Verfahrens zur Herstellung Polyvinylalkohol-verkapselter Katalysatoren. TU Braunschweig, Dissertation
- QUASTEL JH, STEPHENSON M. 1926. CXLIII. Experiments on "strict" anaerobes, I. The relationship of *B. sporogenes* to oxygen. *Biochem J.* **20**:1125-1137
- REARDON KF, BAILEY JE. 1988 Effects of pH and added metabolites on bioconversions by immobilized non-growing *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Bioeng.* **34**:825-837
- REMMERS P. 1992. Herstellung, Charakterisierung und Einsatz neuer Polymergelperlen als Biokatalysatoren zur kontinuierlichen Denitrifikation von Trinkwasser in einer dazu entwickelten Reaktorkaskade. TU Braunschweig, Dissertation
- REIMANN A, BIEBL H, DECKWER WD. 1996. Influence of iron, phosphate and methyl viologen on glycerol fermentation of *Clostridium butyricum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **45**:47-50

- REIMANN A. 1997. Produktion von 1,3-Propandiol aus Glycerin durch *Clostridium butyricum* DSM 5431 und produkttolerante Mutanten. TU Braunschweig, Dissertation
- REIMANN A, ABBAD-ANDALOUSSI S, BIEBL H, PETITDEMANGE H. 1998a. 1,3-Propanediol formation with product-tolerant mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 in continuous culture: productivity, carbon and electron flow. *J Appl Microbiol.* **84**:1125-1130
- REIMANN A, BIEBL H, DECKWER WD. 1998b. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. *Appl Microbiol Biotechnol.* **49**:359-363
- REIMANN C, WELTER K, PRÜSSE U, WILLKE T, VORLOP K-D. 1998. Stoffkonversion nachwachsender Rohstoffe durch einschlußimmobilisierte Biokatalystoren. *Agrartechnische Forschung.* **4**:123-129
- REIMANN C. 1999. Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit immobilisierten Zellen. Landbauforschung Völkenrode. Sonderheft 199. FAL, Braunschweig
- ROBERTS TA. 1967. Sporulation of mesophilic clostridia. *J Appl Bacteriol.* **30**(3):430-443
- ROSE T, NEUMANN B, THIELKING H, KOCH W, VORLOP KD. 2000. Hohlkugeln aus Sulfoethylcellulose (SEC) auf Basis von Polyelektrolytkomplexen. *Chem Ing Tech.* **72**(1+2):107-110
- RUCH FE, LENGELER J, LIN ECC. 1974. Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol.* **119**(1):50-56
- SACKS LE. 1983. Influence of carbohydrates on growth and sporulation of *Clostridium perfringens* in a defined medium with or without guanosine. *Appl Environ Microbiol.* **46**(5):1169-1175
- SACKS LE, THOMPSON PA. 1978. Clear, defined medium for the sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol.* **35**(2):405-410
- SAINT-AMANS S, PERLOT P, GOMA G, SOUCAILLE P. 1994. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. *Biotechnol Lett.* **16**:831-836
- SAINT-AMANS S, SOUCAILLE P. 1995. Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat-culture on glucose-glycerol mixtures. *Biotechnol Lett.* **17**(2):211-216
- SCHARA P. 1977. Einschluß von Mikroorganismen in hydrophile, kovalente Polymernetzwerke zum Aufbau und zur Reaktivität von von Biokatalysatoren für Mehrphasenreaktionen. TU Braunschweig, Dissertation
- SCHARDINGER F. 1903. Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke. *Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel sowie der Gebrauchsgegenstände.* **9**(19):865-880
- SCHLEGEL H G. 1986. Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
- SCHLIEKER M. 1999. Mikrobielle Umsetzung von Rohglycerin zu 1,3-Propandiol mit immobilisierten Zellen von *Clostridium butyricum* im kontinuierlichen Rührreaktor. TU Braunschweig, Diplomarbeit
- SCHLIEKER M, BOCK R, KOSCHIK I, WITTLICH P, VORLOP KD. 2001. Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit freien und immobilisierten Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024.

7. Symposium „Nachwachsende Rohstoffe für die Chemie“, 20.-22.03.2001. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe. Landwirtschaftsverlag Münster. (im Druck)

SCHONBERGER H, BAUMANN A, KELLER W. 1997. Study of microbial degradation of polyvinyl alcohol (PVA) in wastewater treatment plants. *American Dyestuff Reporter*. **86**(8):9-18

SCHÜTZ H, RADLER F. 1984. Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *System Appl Microbiol*. **5**:169-178

Shell. 2000. Internet-Information.

URL: <http://www.shellchemicals.com/corterra/1,1098,280,00.html> oder

URL: <http://www.corterra.com>

SHARPELL F, STEGMANN C. 1980. Development of fermentation media for the production of butyric acid. In: *Advances in Biotechnology* **2**. MOO-YOUNG M, ROBINSON CW, Herausgeber. Oxford: Pergamon Press, 71-77

SKRALY FA. 1997. Metabolic engineering of an improved 1,3-propanediol fermentation. University of Wisconsin-Madison, Dissertation.

SMIDSRØD V, SKJÅK-BRÆK G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol*. **8**:71-78

SMITH GR. 2000. Kurzmitteilung "Glycerin als Nebenprodukt". *CITplus*. **3**(3):21-22

SOLOMON BO, ZENG AP, BIEBL H, SCHLIEKER H, POSTEN C, DECKWER WD. 1995. Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and of chemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. *J Bacteriol*. **39**:107-117

SONNLEITNER B. 1983. Biotechnology of thermophilic bacteria – growth, products, and application. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **28**. FIECHTER A, Herausgeber. Springer Verlag. Heidelberg

STOLP H. 1955. Ernährungs- und Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an anaeroben Bakterien: II. Die Physiologie der Entwicklung von Clostridien unter besonderer Berücksichtigung des Reduktions-Oxidations-Potentials. *Archiv für Mikrobiologie* **21**:293

STREEKSTRA H, TEIXEIRA DE MATTOS MJ, NEIJSEL OM, TEMPEST DW. 1987. Overflow metabolism during anerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. *Arch Microbiol*. **147**:268-275

Tate&Lyle. 2000. Internet-Information.

URL: <http://www.tateandlyle.com/irarea/news/articlespress165.htm>

TAG C. 1991. Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. Universität Oldenburg, Dissertation

Tecson. 1999. Informationen zum Weltmarktpreis für Rohöl, 1997-1999.

URL: <http://home.t-online.de/home/tecson/prohoel.htm>

Tecson. 2000. Informationen zum Weltmarktpreis für Rohöl, 1998-2000.

URL: <http://home.t-online.de/home/tecson/prohoel.htm>

TAG C. 1990. Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. Universität Oldenburg, Dissertation

TONG I-T, CAMERON D. 1992. Enhancement of 1,3-propanediol production by cofermentation in *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae dha* regulon genes. *Appl Biochem Biotechnol.* **34/35**:149-159

TRAN-DINH K, HILL FF. 1989. Verfahren zur Herstellung von 1,3-Propandiol. DE 3734 764 A1

VARFOLOMEYEV SD, RAININA EI, LOZINSKY VI, KALYUZHNY SV, SINITSYN AP, MAKHLIS TA, BACHURINA GP, BOKOVA IG, SKLYANKINA OA, AGAFONOV EB. 1990. Application of polyvinyl alcohol crypgels for mimmobilization of mesophilic and thermophilic microorganisms. In: Physiology of immobilized cells. DE BONT JAM, VSSER J, MATTIASSON B, TRAMPER J, Herausgeber. Elsevier Science. Amsterdam

VIJAIKISHORE P, KARANTH NG. 1984. Glycerol production by fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* **9**:243-254

VORLOP KD. 1984. Entwicklung und Verfahren zur Polymerfixierung von Mikroorganismen und Anwendung der Biokatalysatoren zur Spaltung von Penicillin G and Synthese von L-Tryptophan. TU Braunschweig, Dissertation

VORLOP KD, KLEIN J. 1985. Immobilization techniques: cells. In: Comprehensive Biotechnology 2. MOO-YOUNG M, Herausgeber. Pergamon Press. Oxford

VORLOP KD, KLEIN J. 1987. Entrapment of microbial cells in chitosan. *Methods Enzymol.* **135**:259-268

VORLOP KD, STEINERT HJ, KLEIN J. 1987. Cell immobilization with coated alginate beads or hollow fibers formed by ionotropic gelation. *Enzyme Engineering.* **8**:339-342

VORLOP KD, MUSCAT A, BEYERSDORF J. 1992. Entrapment of microbial cells within the polyurethane hydrogel beads with the advantage of low toxicity. *Biotechnol Tech.* **6**:483-488

VORLOP KD, REMMERS P. 1990. Verfahren zur Herstellung von Biokatalysatoren. Deutsches Patent DE 4027218

VORLOP KD, DING A. 1995. Gel aus Polyvinylalkohol und Verfahren zu seiner Herstellung. Deutsches Patent DE 4327923

WIEGEL J. 1986. Methods for study and isolation of thermophiles. In: General, Molecular, and Applied Microbiology. BROCK TD, Herausgeber. John Wiley & Sons. Weinheim.

WIJFFELS RH, DE GOOIJER CD, SCHEPERS AW, TRAMPER J. 1996. Immobilized cell growth; diffusion limitation in expanding micro-colonies. In: Immobilized cells: Basics and applications. WIJFFELS RH, BUITELAAR RM, BUCK C, TRAMPER J, Herausgeber. Elsevier Science. Amsterdam.

WILLKE B. 1992. Problemorientierte Stammentwicklung von *Paracoccus denitrificans* zur Trinkwasserdenitrifikation und neue, lichtmikroskopische Methoden zur In-vivo-Untersuchung von immobilisierten Mikroorganismen. TU Braunschweig, Dissertation

WILLKE B, SEJA U, BUSSE M, FAURIE R, VORLOP KD. 2000. Verfahrensoptimierung: biotechnologische Produktion von L-Tryptophan im industriellen Maßstab. 2. Workshop „Biokonversion nachwachsender Rohstoffe, 14.-15.10.99. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe. Landwirtschaftsverlag Münster. **15**:180-186

Wirtschaftliche Vereinigung Zucker. 2001. Internet-Information.
URL: <http://www.saccharose.de>

WITT U, MÜLLER R, AUGUSTA J, WIDDECKE H, DECKWER W-D. 1994. Synthesis, Properties and biodegradability of polyesters based on 1,3-propanediol. *Macromol Chem Phys*. **195**:793-802

WITTLICH P. 1996. Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit freien und immobilisierten Zellen von *Klebsiella pneumoniae* und *Clostridium butyricum*. TU Braunschweig, Diplomarbeit

WITTLICH P, SCHLIEKER M, WILLKE T, VORLOP KD. 2000. Leistungssteigerung biotechnischer Prozesse durch neuartige Immobilisierungsmethoden für Biokatalysatoren am Beispiel der 1,3-Propandiol-Herstellung. 2. Workshop „Biokonversion nachwachsender Rohstoffe“, 14.-15.10.99. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe. Landwirtschaftsverlag Münster. **15**:112-131

WOODS DR, JONES DT. 1986 Physiological responses of *Bacteroides* and *Clostridium* strains to environmental stress factors. In: Advances in Microbial Physiology. ROSE AH, TEMPEST DW, Herausgeber. **28**:1-64. Academic Press, London

Yellowstone National Park. 2000a. Internet-Information.

URL: <http://www.nps.gov/yell/nature/thermophiles/bioprop.html>

YU H, GU G, SONG L. 1996. Degradation of polyvinyl alcohol in sequencing batch reactors. *Environ Technol*. **17**:1261-1267

ZENG AP, BIEBL H, SCHLIEKER H, DECKWER WD. 1993. Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme Microb Technol*. **15**:770-779

ZENG AP, ROSS A, BIEBL H, TAG C, GÜNZEL B, DECKWER WD. 1994. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnol Bioeng*. **44**:902-911

ZENG AP. 1996. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioproc Eng*. **14**:169-175

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. KLAUS-DIETER VORLOP für die Überlassung des interessanten Themas und das mir dabei entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Insbesondere sein ständiges Interesse an der praktischen Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine guten Ideen waren ein wichtiger Grundstein dieser Arbeit. Danken möchte ich Herrn Prof. Vorlop auch für sein stets offenes Ohr.

130

Herrn PD Dr. SIEGMUND LANG danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt auch der wertvollen Mitarbeit von Herrn MARC SCHLIEKER, Frau ILONA KOSCHIK, Herrn RALF BOCK, Herrn Dr. THOMAS WILLKE, Frau ALEXANDRA THEMANN und Frau NURUL-AINI SRIYANTO. Ohne ihr Engagement und ihre Unterstützung wäre diese Arbeit kaum zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. GARABED ANTRANIKIAN und seinen Mitarbeitern möchte ich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung bei meinem zweiwöchigen Aufenthalt an der TU Hamburg-Harburg danken.

Herrn Dr. JÜRGEN FLECKENSTEIN vom Institut für Pflanzenernährung der FAL danke ich für die Durchführung der Glycerinanalysen. Für die Anfertigung der Dünnschnitte von LentiKats® danke ich Herrn Dr. OLIVER PABST vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig.

Für das zur Verfügung stellen der verschiedenen Glycerinproben danke ich der Oelmühle Conemann in Leer, Ostfriesland, und den Prignitzer Chemie Werken in Wittenberge, Brandenburg. Herrn Dr. LAWRENCE NAKAMURA von der *Agricultural Research Service Culture Collection* (Peoria, IL, USA) danke ich für die Überlassung des Bakterienstammes *Clostridium butyricum* NRRL B-1024.